

Spezifische Spaltungen und Modifizierungen
der Phenylalanin-spezifischen
Transfer-Ribonucleinsäure aus Hefe

Wolfgang Wintermeyer

1972

Spezifische Spaltungen und Modifizierungen der
Phenylalanin-spezifischen Transfer-Ribonucleinsäure
aus Hefe.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Wolfgang Wintermeyer
aus Mannheim

München 1972



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. G. Zachau
Tag der mündlichen Prüfung: 7.6.1972

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München in der Zeit vom Juni 1968 bis September 1971 ausgeführt.

Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

P. Philippsen, R. Thiebe, W. Wintermeyer und H.G. Zachau

Biochem. Biophys. Res. Commun. 33 (1968) 922

R. Römer, D. Riesner, G. Maass, W. Wintermeyer, R. Thiebe und H.G. Zachau, FEBS-Letters 5 (1969) 15

W. Wintermeyer, R. Thiebe, H.G. Zachau, D. Riesner,

R. Römer und G. Maass, FEBS-Letters 5 (1969) 23

W. Wintermeyer und H.G. Zachau, FEBS-Letters 11 (1970) 160

W. Wintermeyer und H.G. Zachau, FEBS-Letters 18 (1971) 214

Herr Prof. Dr. H.G. Zachau hat diese Arbeit durch ständige Anteilnahme und Anregungen sehr gefördert; dafür danke ich vielenmals. Herrn Dr. R. Thiebe danke ich herzlich für die vielen Ratschläge und Diskussionen, die mir oft weitergeholfen haben. Meinen Kollegen hier danke ich für anregende Diskussionen und die Überlassung von Material. Herrn Dr. G. Maass und seinen Mitarbeitern, Herrn Dr. D. Riesner und Herrn Dr. R. Römer danke ich für die gute Zusammenarbeit in Stöckheim. Frl. J. Patzschke danke ich für ihre Hilfe bei einigen Experimenten.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung und Problemstellung.	1
2. Chemische Spaltung von tRNA in große Fragmente.	6
2.1. Basenkatalysierte Spaltung der tRNA ^{Phe} nach der Abspaltung einzelner Basen	6
2.1.1. Basenkatalysierte Spaltung nach der Abspaltung von Y ⁺ .	7
2.1.1.1. Analytischer Nachweis der Spaltung der tRNA ^{Phe} (HCl) in Halbmoleküle	7
2.1.1.2. Isolierung und Identifizierung der Halbmoleküle der tRNA ^{Phe} .	12
2.1.1.3. Versuch zur Identifizierung des 3'-Endes von Phe 1-36.	13
2.1.1.4. Spaltung von Gm-A-A-Ribose-A-Y mit Anilin. Trennung der Produkte und ihre Identifizierung durch enzymatischen Abbau.	17
2.1.1.5. Reduktion der Produkte der Anilinspaltung von Gm-A-A-Ribose-A-Y mit ³ H-NaBH ₄ . Abbau durch alkalische Hydrolyse.	19
2.1.1.6. Umsetzung von Ribose-5-phosphat mit Anilin.	23
2.1.2. Diskussion. Mechanismus der Spaltung der tRNA ^{Phe} (HCl) mit Anilin.	23
2.1.3. Basenkatalysierte Spaltung nach der Abspaltung von 7-Methylguanin.	27
2.1.3.1. Umwandlung des freien 7-Methylguanosins durch Behandlung mit Alkali. Nachweis der Säurelabilität des Produkts.	28
2.1.3.2. Analytischer Nachweis der Spaltung der tRNA ^{Phe} (HCl), tRNA ^{Phe} und des Fragments Phe 38-76 an der m ⁷ G-Position.	29
2.1.3.3. Spaltung der tRNA ^{Phe} (HCl) an den Positionen von m ⁷ G und Y. Isolierung der Produkte.	32
2.1.3.4. Oligonucleotidanalyse des Fragments Phe 47-76.	33

2.1.3.5. Spaltung reduzierter tRNA ^{Phe} (HCl) an der m ⁷ G-Position. Isolierung der Produkte.	36
2.2. Spezifische Spaltung von tRNA durch alkalische Hydrolyse in Gegenwart von Mg ⁺⁺ -Ionen.	37
2.2.1. Mg ⁺⁺ -katalysierte Spaltung der tRNA ^{Phe} .	39
2.2.2. Isolierung und Identifizierung der Fragmente Phe 1-16 und Phe 17-76.	44
2.2.3. Mg ⁺⁺ -katalysierte Spaltung der tRNA ^{Phe} (HCl) und der Kombination der Halbmoleküle Phe 1-36 + Phe 38-76.	46
2.2.4. Mg ⁺⁺ -katalysierte Spaltung der tRNA ^{Ser} .	49
2.2.5. Diskussion.	51
3. Ersatz der Base Y ⁺ in tRNA ^{Phe} durch kovalent gebundene, fluoreszierende Gruppen.	53
3.1. Umwandlung der freien Ribose in tRNA ^{Phe} (HCl) in Erythrose.	54
3.2. Vergleich des Proflavin-Einbaus in tRNA ^{Phe} (HCl) und tRNA ^{Phe} (HCl, H ₂ O ₄).	55
3.3. Einbau von Proflavin und Ethidiumbromid in tRNA ^{Phe} (HCl)	55
3.4. Stabilisierung der tRNA ^{Phe} -Farbstoff-Verbindungen durch Reduktion mit NaBH ₄ .	57
3.5. Isolierung der tRNA ^{Phe} -Farbstoff-Verbindungen.	59
3.6. Oligonucleotidanalysen der tRNA ^{Phe} -Farbstoff-Verbindungen.	61
3.7. Spektrale Eigenschaften der tRNA ^{Phe} -Farbstoff-Verbindungen.	62
3.8. Diskussion.	64
4. Helix-Knäuel-Übergänge in Halbmolekülen der tRNA ^{Phe} aus Hefe und Weizen.	65
4.1. Untersuchung der getrennten und rekombinierten Halbmoleküle der tRNA ^{Phe} aus Hefe.	67
4.2. Untersuchung der Halbmoleküle der tRNA ^{Phe} aus Hefe und Weizen und ihrer homologen und heterologen Kombinationen.	77

5. Untersuchung der tRNA ^{Phe} -Fragmente und der tRNA ^{Phe} -Farbstoff-Verbindungen in biochemischen Testsystemen.	84
5.1. Untersuchung der tRNA ^{Phe} -Fragmente.	85
5.1.1. Aminoacylierung.	85
5.1.2. Kinetik der Aminoacylierung der tRNA ^{Phe} in Gegenwart der Halbmoleküle.	90
5.1.3. Poly U-abhängige Bindung an Ribosomen aus E. coli.	91
5.2. Untersuchung der PF-markierten tRNA ^{Phe} .	92
5.3. Diskussion.	93
6. Beschreibung der Versuche.	97
6.1. Chemische tRNA-Spaltungen.	97
6.1.1. Spaltung der tRNA ^{Phe} (HCl) und des Hexanucleotids-Y ⁺ mit Anilin.	97
6.1.2. Spaltung an der m ⁷ G-Position.	98
6.1.3. Mg ⁺⁺ -katalysierte Spaltung der tRNA ^{Phe} .	98
6.1.4. Abspaltung des 3'-terminalen Nucleosids aus tRNA (Whitfield-Abbau).	98
6.1.5. Alkalische Totalhydrolyse von Oligonucleotiden.	99
6.2. Abtrennung zweiwertiger Kationen von tRNA.	99
6.3. Einbau von Fluoreszenzfarbstoffen in tRNA ^{Phe} (HCl).	99
6.3.1. Proflavin.	100
6.3.2. Ethidiumbromid.	100
6.3.3. Reduktion der tRNA ^{Phe} -Farbstoff-Verbindungen.	100
6.4. Reduktionen mit Natriumborhydrid.	101
6.5. Abspaltung terminaler Phosphatgruppen von tRNA. Bestimmung des freigesetzten anorganischen Phosphats.	101
6.6. Nuclease-Spaltungen.	102
6.7. Säulenchromatografie von Oligonucleotiden.	103
6.8. Einbau von Phenylalanin in tRNA ^{Phe} und Fragmentkombinationen.	103

	Seite
6.9. Ribosomenbindungstest.	104
6.10. Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgelen.	104
6.11. Dünnschicht- und Papierchromatografie. Zuckernachweis.	106
6.12. Papierelektrophorese.	107
6.13. Radioaktivitätsmessungen.	107
6.14. Apparative Hilfsmittel.	107
6.15. Materialien.	108
7. Zusammenfassung.	111
8. Literaturverzeichnis.	116
9. Verzeichnis der Abkürzungen.	124

1. Einleitung und Problemstellung.

Die Funktion der tRNAs in der Biosynthese der Proteine ist in ihren Grundzügen bekannt (1,2,3). Im Verlauf der Proteinsynthese treten die tRNAs in Wechselwirkung mit verschiedenen Proteinen und Nucleinsäuren. Die Frage, welche Elemente ihrer Struktur die tRNAs zu diesen, zum Teil sehr spezifischen Wechselwirkungen befähigen, konnte erst teilweise geklärt werden. So sind die molekularen Grundlagen der spezifischen Wechselwirkungen der tRNAs mit den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen noch unbekannt. Es ist offen, ob einige aufeinanderfolgende Nucleotide oder Basenpaare einer tRNA von der für diese tRNA spezifischen Synthetase erkannt werden, oder ob die Synthetase-erkennungsstelle erst durch das Zusammenlagern weit voneinander entfernter Bereiche des Moleküls bei der Ausbildung der Tertiärstruktur entsteht (4). Aus dem Befund, daß reversibel denaturierte tRNAs nicht aminoacylierbar sind (5,6), geht hervor, daß die Funktion der tRNAs an das Vorliegen einer bestimmten Konformation gebunden ist.

Die räumliche Struktur der tRNAs ist nicht bekannt. Die bisher durch Röntgenstrukturanalyse von tRNA-Kristallen erhaltenen Ergebnisse erlaubten einige Aussagen über die Dimensionen der Moleküle und ihre Anordnung im Kristall (7). Physikalische Messungen zeigen, daß ein großer Teil der Basen der tRNAs gepaart vorliegt (8,9). Ordnet man die komplementären Sequenzen der tRNAs in doppelsträngigen Bereichen an, so erhält man eine Struktur, die für alle tRNAs ähnlich ist. Abb. 1 zeigt ein solches "Kleeblatt"-Modell der tRNA^{Phe} aus Hefe.

reichen des Moleküls besondere Bedeutung zu. Die Tatsache, daß die einzelnen Bereiche des tRNA-Moleküls enzymatisch oder chemisch verschieden schnell angegriffen werden, zeigt, daß die Polynucleotidkette in der nativen Struktur kompakt gefaltet vorliegt (3,13).

Zur Untersuchung der Synthetaseerkennungsregion der tRNAs wurde eine Reihe von Methoden angewendet (3). Dazu gehört die in letzter Zeit häufig durchgeführte Untersuchung von isolierten tRNA-Fragmenten und ihren Kombinationen. Diese Methode hat ihren Ausgangspunkt in der Beobachtung, daß das Gemisch der Halbmoleküle der tRNA^{Ala} aus Hefe, das durch enzymatische Spaltung in der Anticodon-Schleife entstanden war, noch aminoacylierbar war (14). Später wurde gezeigt, daß die Halbmoleküle der tRNA^{Val} aus Hefe, die isoliert nicht aminoacylierbar waren, beim Mischen wieder die volle Akzeptoraktivität erlangten (15). Die Rekombination von tRNA-Fragmenten mit komplementären Sequenzabschnitten konnte auch direkt nachgewiesen werden (16). Durch Kombination geeigneter Fragmente kann man nun modifizierte tRNA-Moleküle herstellen, denen ein Teil der Nucleotide der nativen tRNA fehlt. Ist eine solche Fragmentkombination noch aminoacylierbar, so kann man daraus schließen, daß die fehlenden Nucleotide für die Wechselwirkung mit der Aminoacyl-tRNA-Synthetase und für die Aminoacylierung nicht notwendig sind. Darüber hinaus läßt sich ausschließen, daß diese Nucleotide eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der nativen Konformation der tRNA spielen.

Geht man davon aus, daß die doppelhelicalen Abschnitte der tRNA-Struktur auch isoliert stabil sind, dh. auch in tRNA-

Fragmenten vorliegen, so kann man annehmen, daß die Untersuchung der Struktur von Fragmenten und ihren Kombinationen Aufschlüsse über die Strukturelemente der tRNA geben kann.

tRNA-Fragmente wurden meist durch kontrollierte Einwirkung von Endonucleasen auf tRNA erhalten (15,17,18); auch Exonucleasen wurden verwendet (19). Schon früh wurde versucht, die enzymatischen Methoden, die immer zu Spaltungen in exponierten Bereichen des tRNA-Moleküls führen, durch chemische Spaltungen zu ergänzen (20,21). Die spezifische Spaltung einer Nucleinsäure setzt voraus, daß von den chemisch gleichartigen Phosphodiesterbindungen eine schneller angegriffen wird als die anderen. Spaltet man eine Base aus einer Nucleinsäure oder einem Oligonucleotid ab, so weist die Phosphorsäure-esterbindung am C-Atom(3) des entstandenen Zuckers mit freier Aldehydgruppe eine erhöhte Labilität gegenüber Basen auf (22). Nachdem eine Methode zur spezifischen Abspaltung von Uracil aus RNA entwickelt worden war (23,24), gelang auf Grund dieser erhöhten Labilität die Spaltung von tRNA an den Positionen der abgespaltenen Uracilbasen durch Einwirkung von Alkali (25) oder primären Aminen (26). Da Uracil jedoch sehr häufig in tRNA vorkommt, konnten mit dieser Methode keine großen tRNA-Fragmente hergestellt werden. Die Abspaltung einer einzelnen Base aus tRNA gelang Thiebe und Zachau (27) mit der Abspaltung der Base Y^+ aus Hefe tRNA^{Phe}. Damit bot sich nun die Möglichkeit, die tRNA^{Phe} an einer Stelle selektiv zu spalten.

Andererseits schien es auch möglich zu sein, durch Reaktion mit der durch Abspaltung von Y^+ gebildeten freien Aldehydgruppe der tRNA^{Phe}(HC1) Substituenten in die tRNA einzuführen, dh. Y^+

durch andere Moleküle zu ersetzen. Von besonderem Interesse war dabei zunächst der Einbau von stark fluoreszierenden Verbindungen. Befindet sich an einem Makromolekül eine geeignete fluoreszierende Gruppe, so kann man Konformationsänderungen des Makromoleküls durch Fluoreszenzmessungen verfolgen (28,29). Von den in tRNA vorkommenden Basen zeigt nur Y^+ in $tRNA^{Phe}$ in wässriger Lösung bei Raumtemperatur eine Fluoreszenz, deren Quantenausbeute allerdings niedrig ist. Die allgemeine Anwendung der Fluoreszenzmessung für Konformationsstudien setzt daher den Einbau fluoreszierender Gruppen in das tRNA-Molekül voraus, eine Technik, die bei Proteinen häufig angewendet wurde (28).

Zur Einführung fluoreszierender Moleküle in tRNA wurden verschiedene Methoden beschrieben: Reaktion mit den Purinbasen (30,31), Bindung an das perjodatoxydierte 3'-endständige Adenosin (32,33), Ersatz diese Nucleosids durch enzymatischen Einbau von Formycin (34) und nicht-kovalente Assoziation (35-39). Keine dieser Methoden ermöglichte den Einbau einer fluoreszierenden Gruppe mit hoher Quantenausbeute in eine definierte Position der tRNA ohne Änderung der nativen tRNA-Struktur und/oder Verlust der biologischen Aktivität.

Ausgehend von der Möglichkeit, in $tRNA^{Phe}$ durch Abspaltung von Y^+ eine reaktionsfähige Aldehydgruppe zu erzeugen, ergaben sich folgende Fragen, die in der vorliegenden Arbeit zunächst geklärt werden sollten:

1) Läßt sich $tRNA^{Phe}(HC1)$ an der freien Ribose unter Bedingungen spalten, bei denen die übrigen Molekülteile intakt bleiben?

- 2) Ist eine ähnliche Reaktion auch auf andere, selten in tRNA vorkommende Nucleoside anzuwenden?
- 3) Kann man durch Reaktion der Aldehydgruppe mit geeignet substituierten Verbindungen fluoreszierende Gruppen kovalent mit der tRNA verknüpfen?
- 4) Liegen in den isolierten tRNA-Fragmenten die im Kleeblattmodell angegebenen Doppelstrangbereiche vor und lassen sich aus der Untersuchung der Struktur der Fragmente Rückschlüsse auf die Struktur der intakten tRNA ziehen?
- 5) Wie verhält sich die durch Spaltung oder Ersatz der Base Y^+ modifizierte $tRNA^{Phe}$ in biochemischen Testsystemen?

2. Chemische Spaltung von tRNA in große Fragmente.

2.1. Basenkatalysierte Spaltung der $tRNA^{Phe}$ nach Abspaltung einzelner Basen.

Im folgenden werden Versuche zur spezifischen, chemischen Spaltung der aus $tRNA^{Phe}$ durch Abspaltung von Y^+ gebildeten $tRNA^{Phe}(HC1)$ beschrieben. Das Reaktionsprinzip: Abspaltung des Basenanteils eines seltenen Nucleosids und Spaltung der RNA-Kette an der zurückbleibenden Ribose, ließ sich auch auf 7-Methylguanosin anwenden.

Inzwischen wurde auch eine analoge Spaltung der $tRNA^{Phe}$ an den Positionen des Dihydrouracils beschrieben (40).

2.1.1. Basenkatalysierte Spaltung nach der Abspaltung von Y^+ .

2.1.1.1. Analytischer Nachweis der Spaltung der $tRNA^{Phe(HCl)}$ in Halbmoleküle.

Bei der Umsetzung der $tRNA^{Phe(HCl)}$ mit primären und sekundären Aminen sowie mit Alkali trat die erwartete Spaltung in zwei fast gleich große Fragmente ein, die durch Disk-Elektrophorese in Polyacrylamid-Geld nachgewiesen wurden (Abb.2).

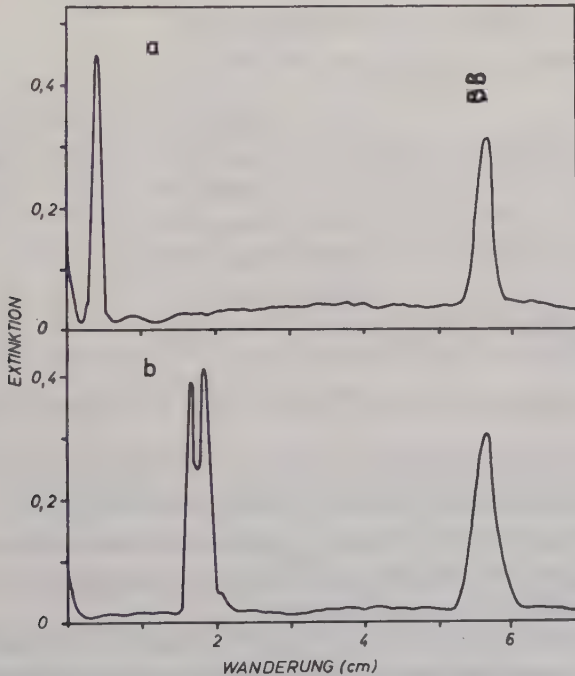


Abb.2: Densitogramme der Disk-Elektrophoresen von
a) $tRNA^{Phe(HCl)}$ und b) anilinbehandelter $tRNA^{Phe(HCl)}$.

tRNA^{Phe} und reduzierte tRNA^{Phe}(HCl), bei der die freie Aldehydgruppe mit NaBH₄ reduziert worden war (6.4. Methode A), blieben bei der Behandlung mit Anilin vollkommen intakt. Ein tertiäres Amin und Phenylhydrazin bewirkten keine Spaltung der tRNA^{Phe}(HCl); vgl. Tabelle 1.

Base	pK-Wert	Bedingungen	Spaltung	Lit.
0.3M Anilin	4.7	pH 3.5; 2Std; 25°	++	
"		pH 5 ; 2Std; 25°	++	(41)
"		pH 6 ; 2Std; 25°	+	
"		pH 7 ; 2Std; 25°	(+)	
0.3M N-Methylanilin	4.8	pH 3.5; 2Std; 25°	+	
0.3M N,N-Dimethylanilin	5.2	pH 3.5; 2Std; 25°	-	
0.4M Lysin		pH 8.5; 2Std; 45°	++	(42)
0.4M Cyclohexylamin	11.7	pH 10.2; 2Std; 45°	++	(43)
0.05M Glycin	9.8	pH 10 ; 4Std; 37°	-	(44)
"		pH 10; 16Std; 37°	(+)	"
0.05M Na ₂ CO ₃		pH 10; 4Std; 37°	-	"
"		pH 10; 16Std; 37°	(+)	"
0.3M Phenylhydrazin	5.2	pH 3.5, 5 u. 7 2 Std 37°	-	

Tabelle 1: Umsetzung der tRNA^{Phe}(HCl) mit verschiedenen Basen.

Die Durchführung der Versuche ist in 6.1.1. beschrieben.

Die Ergebnisse der disk-elektrophoretischen Trennungen werden wie folgt charakterisiert: ++ fast vollständige Spaltung, + etwa die Hälfte der tRNA^{Phe}(HCl) gespalten, (+) Halbmoleküle erkennbar, - keine Spaltung.

Die Literaturzitate der letzten Spalte beziehen sich auf Arbeiten, in denen die betreffenden Basen unter den angegebenen Bedingungen zur Abspaltung des perjodat-oxidierten 3'-terminalen Nucleosids aus RNA benutzt wurden.

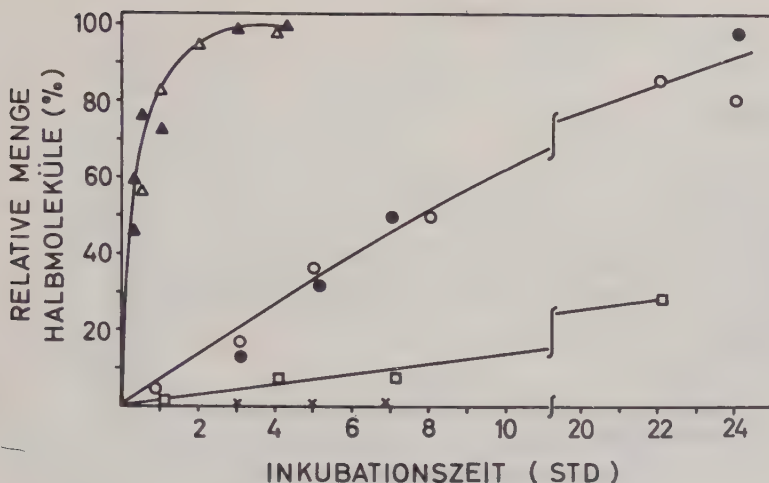


Abb. 3: Kinetik der Spaltung der $tRNA^{Phe}(HCl)$ mit Anilin und dessen N- Methylderivaten.

5 A_{260} -Einheiten/ml $tRNA^{Phe}(HCl)$ wurden in 0.3M Amin bei 25° inkubiert. Aliquots von 0.05-0.1 A_{260} -Einheiten wurden disk- elektrophoretisch getrennt. Die angegebenen Werte wurden durch quantitative Auswertung der Densitogramme erhalten.

Anilin pH 7: $\square$, pH 5: $\triangle$, pH 3.5: $\blacktriangle$; N- Methylanilin, pH 3.5, mit 0.5 % Anilin: $\circ$, mit 1 % Anilin: $\bullet$; N,N- Dimethylanilin, pH 3.5, mit 10 % Äthanol: $\times$.

Zur genaueren Charakterisierung der Reaktion wurde die pH-Abhängigkeit der Spaltung mit Anilin und die Reaktion mit den N-Methylderivaten des Anilins untersucht (Abb.3). Das verwendete N-Methylanilin enthielt noch 0.5 % Anilin (entsprechend 1.5 mM Anilin in 0.3 M N-Methylanilin); die Verdopplung der Anilinkonzentration veränderte die Reaktionsgeschwindigkeit nicht. Auch bewirkte 1.5 mM Anilin allein unter sonst gleichen Bedingungen keine Spaltung. Die mit N-Methylanilin beobachtete Spaltung war demnach auf das sekundäre Amin zurückzuführen.

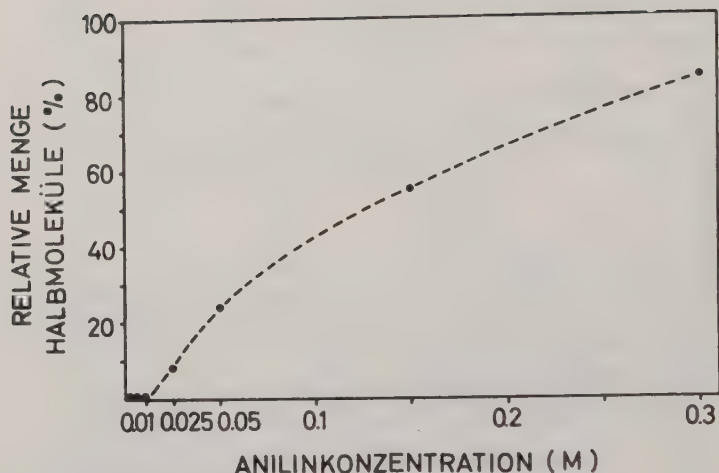


Abb. 4: Spaltung der tRNA^{Phe}(HCl) in Abhängigkeit von der Anilin-Konzentration.

7 A₂₆₀-Einheiten/ml tRNA^{Phe}(HCl) wurden 2 Std. bei 25° in 0.01M Na-Acetat, pH 5, in Anwesenheit der angegebenen Anilinkonzentrationen inkubiert; die Gesamt-Salzkonzentration wurde durch Zugabe von NaCl jeweils auf 0.3M gebracht.

Die starke Beschleunigung der Reaktion mit Anilin beim Übergang von neutralem zu saurem pH-Wert ist für die Diskussion eines Reaktionsmechanismus' von Bedeutung.

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Anilins geht aus Abb. 4 hervor. Bei Konzentrationen unterhalb von etwa 10 mM Anilin trat keine Spaltung mehr ein.

Von allen untersuchten Basen lieferte Anilin die Halbmoleküle der tRNA^{Phe} in guten Ausbeuten unter den mildesten Bedingungen. Alle weiteren Spaltungen wurden deshalb mit Anilin durchgeführt.

Die mit Hilfe der analytischen Disk-Elektrophorese erhaltenen Ergebnisse wurden durch eine Bestimmung der endständigen Phos-

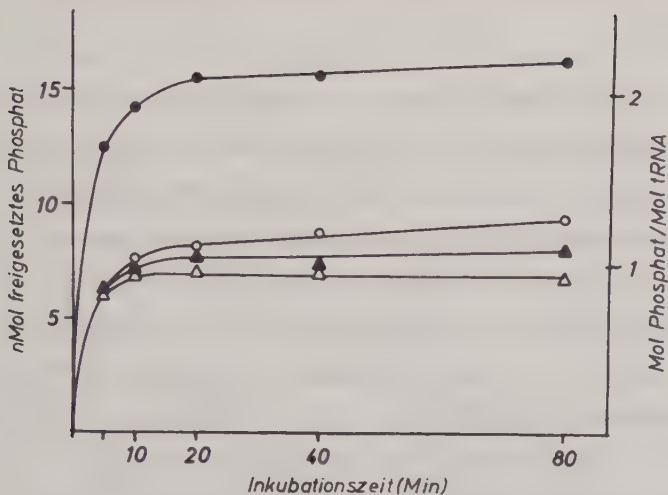


Abb. 5: Freisetzung anorganischen Phosphats mit alkalischer Phosphatase aus jeweils 4.2 A_{260} -Einheiten ($\hat{=}$ 6.7 nMol) tRNA^{Phe} (Δ), tRNA^{Phe}(HCl) ($\circ$), anilinbehandelter tRNA^{Phe} ($\blacktriangle$) und anilinbehandelter tRNA^{Phe}(HCl) ($\bullet$).

phatgruppen ergänzt. Wie Abb. 5 zeigt, entsteht bei der Spaltung der tRNA^{Phe}(HCl) mit Anilin eine zusätzliche Phosphatgruppe, die mit alkalischer Phosphatase abgespalten werden kann. Unspezifische Spaltungen treten bei der Behandlung der tRNA^{Phe} und tRNA^{Phe}(HCl) mit Anilin offenbar nicht oder nur in geringem Umfang auf. Die langsame Freisetzung weiteren Phosphats aus tRNA^{Phe}(HCl) bei längerer Einwirkung der Phosphatase ist wohl auf eine langsame Spaltung in Halbmoleküle zurückzuführen.

2.1.1.2. Isolierung und Identifizierung der Halbmoleküle der tRNA^{Phe}.

Die Spaltung der tRNA^{Phe}(HC1) mit Anilin verlief auch bei präparativen Ansätzen nahezu vollständig; die Durchführung ist in 6.1.1. beschrieben. Die Produkte der Spaltung konnten durch Säulenchromatografie voneinander getrennt werden (45,46); Abb. 6 zeigt das Elutionsprofil.

Mit Hilfe radioaktiver Markierungen wurde das Material aus Gipfel 1 als Phe 38-76, das der beiden folgenden Gipfel als Phe 1-36 identifiziert (45).

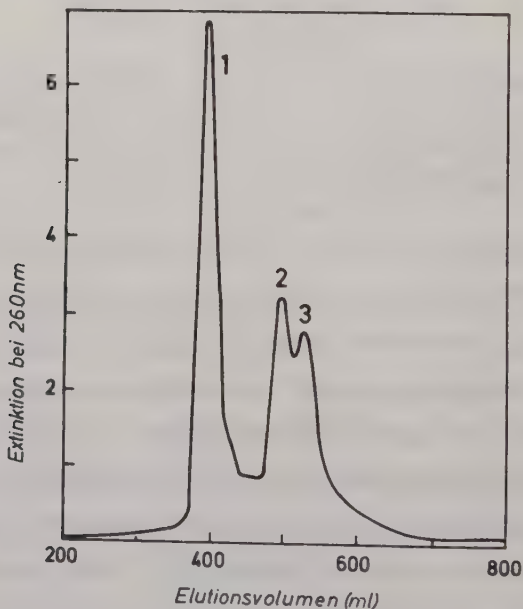


Abb.6: Trennung der Halbmoleküle der tRNA^{Phe} durch Säulenchromatografie.

450 A₂₆₀-Einheiten tRNA^{Phe}(HC1) wurden mit Anilin behandelt (6.1.1.) und das Gemisch der Produkte in 10 ml 7M Harnstoff, pH 3, auf eine DEAE-Sephadex A25-Säule (1 x 200 cm) aufgetragen. Eluiert wurde bei Raumtemperatur mit einem linearen NaCl-Gradienten (je 500 ml 0.2 und 0.5M NaCl in 7M Harnstoff, pH 3).

Die Analyse der durch vollständige Spaltung mit T_1 -RNase aus Phe 38-76 gebildeten Oligonucleotide (47) bestätigte diese Zuordnung; sie zeigte außerdem, daß Phe 38-76 eine 5'-endständige Phosphatgruppe trug. Der (nicht bei jeder Isolierung beobachtete) Doppelgipfel (Abb.6), der Phe 1-36 enthielt, deutete auf eine Heterogenität des Fragments hin. Die Oligonucleotidanalyse nach der Reduktion des Fragments mit $^3\text{H-NaBH}_4$ und vollständiger Spaltung mit T_1 -RNase (47) bestätigte die Zuordnung als Phe 1-36. Weiter zeigte die Analyse, daß das 3'-terminale Oligonucleotid des Fragments, Cm-U-Cm-A-A-(rib), nicht einheitlich war. Es enthielt etwa 1 Äquivalent ^3H je Mol Oligonucleotid. Da die einzelnen Nucleotide unter den angewendeten Reduktionsbedingungen nicht angegriffen werden (47,48), mußte das Produkt (rib), das bei der Spaltung der RNA-Kette mit Anilin aus der Ribose entstanden war, reduziert worden sein. Alle anderen Oligonucleotide aus Phe 1-36 waren einheitlich, so daß die beobachtete Heterogenität des Fragments wahrscheinlich auf verschiedene Produkte (rib) am 3'-Ende von Phe 1-36 zurückzuführen ist.

2.1.1.3. Versuch zur Charakterisierung des 3'-Endes von Phe 1-36.

Aus den analytischen Versuchen geht hervor, daß die Spaltung der $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ mit Anilin unter Abspaltung des Phosphorsäureesters vom C-Atom(3) der Ribose mit der freien Aldehydgruppe vor sich ging. Für den Ablauf dieser Reaktion sind mehrere Wege denkbar, die zu verschiedenen Produkten führen (Abb.7).

Der wahrscheinlichste ist die β -Eliminierung, die verschiedentlich für derartige Reaktionen vorgeschlagen wurde (21). Sie sollte als Endgruppe des Fragments Phe 1-36 2-Keto-4,5-dihydroxy-

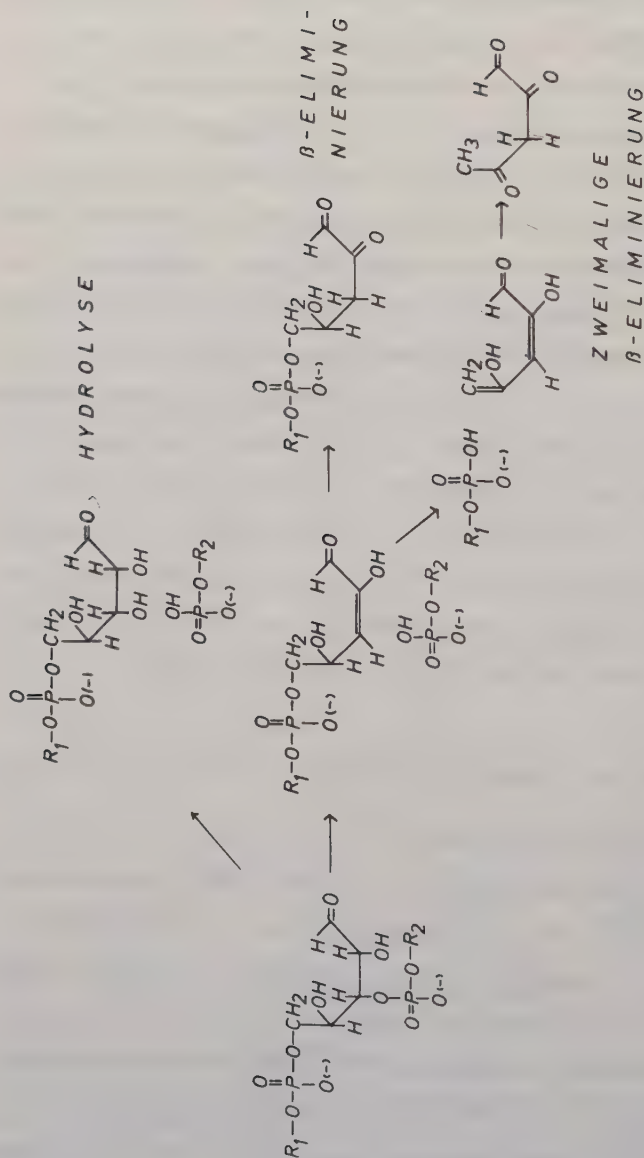


Abb.7: Mögliche Reaktionswege für die basenkatalysierte Spaltung der tRNA^{Phe}(HOL) in schematischer Darstellung.

R₁ und R₂ deuten die Fortsetzung der RNA-Kette zum 5'- bzw. 3'-Ende an.

valeraldehyd liefern, der über das C-Atom(5) mit der 3'-Phosphatgruppe des Adenosins(36) verestert ist.

Zweimalige β -Eliminierung unter Bildung von zwei endständigen Phosphatgruppen wurde bei der alkalischen Spaltung von depurinierter DNA beobachtet (49). Aus einer kürzlich erschienenen Arbeit von Turchinsky et al. (50) geht hervor, daß bei der Spaltung von tRNA, die Ribosereste mit freien Aldehydgruppen enthält, und von A-Ribosep mit p-Anisidin anscheinend die zweimalige β -Eliminierung stattfindet.

Für die hier betrachtete Spaltung mit Anilin ließ sich dieser Reaktionsweg ausschließen, da bei der Spaltung der tRNA^{Phe}(HCl) nur ein zusätzliches, endständiges Phosphat entstand (Abb.6). Dieser Befund wurde gesichert durch eine Bestimmung des endständigen Phosphats des isolierten Fragments Phe 1-36. Sie zeigte, daß Phe 1-36 nur eine endständige Phosphatgruppe besitzt (Tabelle 2). Diese befindet sich, wie die Oligonucleotidanalyse zeigte (47), am 5'-Ende des Fragments.

	Eingesetzte Menge (A ₂₆₀ -Einh.)	Freigesetztes Phosphat (nMol)	Mol Phosphat Mol RNA
Phe 1-36	1.9	7.0	1.1
Phe 1-36 Whitf.	2.4	9.0	1.1
tRNA ^{Phe}	2.7	4.3	1.0
tRNA ^{Phe} Whitf.	3.1	10.5	2.1

Tabelle 2: Quantitative Bestimmung der endständigen Phosphatgruppen von Phe 1-36 und tRNA^{Phe} vor und nach Behandlung mit Perjodat und Anilin (Whitfeld-Abbau).

Die Behandlung mit Perjodat und Anilin ist in 6.1.4. und 6.1.1. beschrieben, die Abspaltung der Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase und die Phosphatbestimmung in 6.5. Der Berechnung wurden folgende Werte zugrunde gelegt:

1 A₂₆₀-Einheit Phe 1-36 $\hat{=}$ 3.3. nMol; 1 A₂₆₀-Einheit tRNA^{Phe}
 $\hat{=}$ 1.6 nMol.

Durch die Behandlung des Fragments Phe 1-36 mit Perjodat und Anilin, die bei $tRNA^{Phe}$ zur Entstehung einer zweiten endständigen Phosphatgruppe führte, wurde kein zweites Phosphat als Endgruppe gebildet (Tabelle 2). Damit konnte ein Nucleosid mit freien 2'-Hydroxylgruppen als 3'-Ende von Phe 1-36, das als Produkt einer Abspaltung von Ribose-5-phosphat bei der Abspaltung der $tRNA^{Phe}(HCl)$ denkbar ist, ausgeschlossen werden; dieser Reaktionsweg ist nicht in Abb.7 gezeigt.

Ribose als Endgruppe, die das Produkt einer hydrolytischen Spaltung der RNA-Kette wäre (Abb.7), ließ sich nicht analog ausschließen, denn bei der Reaktion mit Perjodat wird sicher auch die C(3)-C(4)-Bindung einer offenkettigen Ribose gespalten. Die dadurch entstehende Aldehydgruppe am C-Atom(4) hätte keine aktivierende Wirkung für die Abspaltung des Phosphorsäureesters von C-Atom(5).

Es blieb demnach offen, ob das 3'-Phosphat des Adenosins(36) in Phe 1-36 mit 2-Keto-4,5-dihydroxyvaleraldehyd, dem Produkt der β -Eliminierung, oder mit Ribose, dem Produkt der Hydrolyse, verestert war. Eine Entscheidung sollte die im folgenden beschriebene Untersuchung der aus Gm-A-A-Ribose-A- Ψ (Hexanucleotid- Y^+) bei der Spaltung mit Anilin entstehenden Produkte ermöglichen.

2.1.1.4. Spaltung von Gm-A-A-Ribose-A- Ψ mit Anilin. Trennung der Produkte und ihre Identifizierung durch enzymatischen Abbau.

Das Hexanucleotid- Ψ^+ wurde unter Standard-Bedingungen mit Anilin umgesetzt (6.1.1.). Kleine Mengen der Reaktionsprodukte wurden durch Papierelektrophorese bei pH 2.7 voneinander getrennt. Dabei traten neben ungespaltenem Hexanucleotid- Ψ^+ ($R_{Up} = 0.64$) zwei UV-absorbierende Substanzen mit R_{Up} -Werten von 0.48 bzw. 0.13 auf. Bei größeren Ansätzen wurden die Produkte durch Säulenchromatografie isoliert; Abb. 8 zeigt ein solches Elutionsprofil.

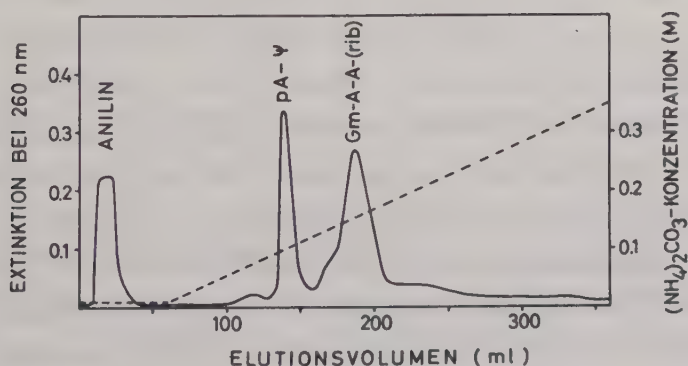


Abb.8: Trennung der Anilin-Spaltprodukte von Gm-A-A-Ribose-A- Ψ durch Säulenchromatografie.

25 A₂₆₀-Einheiten Gm-A-A-Ribose-A- Ψ wurden mit Anilin behandelt (6.1.1.); die Spaltprodukte wurden an DEAE-Cellulose chromatografiert (6.7.2.).

Das Material des ersten Gipfels, das schon beim Waschen der beladenen Säule eluiert wurde, wurde auf Grund der UV-Spektren als Anilin identifiziert. Das Material des zweiten Gipfels lieferte bei der Spaltung mit Schlangengift-PDE (6.6.1.) Adenosin-

phosphat und Pseudouridinphosphat in äquimolaren Mengen. Demnach handelte es sich um das Dinucleotid pA-Ψ. Bei der Identifizierung des Materials aus dem letzten Gipfel, das Gm-A-A-(rib) sein sollte, kam es nun darauf an, Abbaumethoden anzuwenden, die eine evtl. vorhandene Ribose sicher freisetzen.

Einige enzymatische Abbaumethoden wurden zunächst mit dem Hexanucleotid-Ψ⁺ getestet. Nur die Spaltung mit der PDE aus Schweinemilz (6.6.1.) führte zu eindeutig identifizierbaren Produkten. Bei der Trennung der Produkte durch Papierelektrophorese (pH 2.7) wurden, neben einer geringen Menge ungespaltenen Ausgangsmaterials, die erwartete Menge Gmp ($R_{Up} = 0.7$) und zwei schlecht getrennte, UV-absorbierende Substanzen ($R_{Up} = 0.1$) erhalten; diese konnten durch Papierchromatografie in System A getrennt und als Pseudouridin und Adenosinphosphat identifiziert werden. Durch Färbung des Elektrophoresepapiers mit Perjodat und Benzidin wurde außerdem eine Substanz nachgewiesen, die wie Ribose-5-phosphat ($R_{Up} = 1.3$) gewandert war. Die Behandlung des Hexanucleotids-Ψ⁺ mit Milz-PDE führte demnach zur Spaltung unter Freisetzung von Ribose-3-phosphat.

Das Material des dritten Gipfels (Abb.8) wurde analog mit Milz-PDE behandelt. Das Produktgemisch wurde zunächst auf Papier in System A chromatografiert. Auf dem Chromatogramm konnte keine Ribose nachgewiesen werden; etwa 10 % der zu erwartenden Menge wären noch nachzuweisen gewesen. Das UV-absorbierende Material, das bei der Chromatografie nicht von der Startzone weggewandert war, wurde papierelektrophoretisch getrennt und als Gmp und Ap im molaren Verhältnis 1:2 identifiziert. Es handelte sich demnach um das erwartete Trinucleotid-Derivat Gm-A-A-(rib); (rib) war offenbar nicht Ribose. Um diesen Befund

zu sichern, wurde als zweite Abbaumethode die alkalische Hydrolyse gewählt.

2.1.1.5. Reduktion der Produkte der Anilinspaltung des Hexanucleotids- Y^+ mit 3H - $NaBH_4$. Abbau durch alkalische Hydrolyse.

Die alkalische Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen in RNA erfordert Bedingungen, unter denen Ribose nicht stabil ist. So wurde zunächst untersucht, ob eine Reduktion von Ribose zu alkalistabilem Ribit möglich ist. Dabei bot sich gleichzeitig die Möglichkeit, durch Einführung einer radioaktiven Markierung den Nachweis der Produkte zu erleichtern.

Durch Reduktion von Ribose-5-phosphat mit 3H - $NaBH_4$ (6.4. Methode B) wurde ein Produkt erhalten, das auf der Papierelektrophorese einheitlich war ($R_{Up} = 1.1$. bei pH 2.7; Ribose-5-phosphat: $R_{Up} = 1.2$). Die Behandlung dieses Produktes mit alkalischer Phosphatase lieferte 3H -Ribit ($R_A = 1.4$ in System B). Die Inkubation unter den Bedingungen der alkalischen Hydrolyse von RNA (6.1.5.) veränderte das elektrophoretische bzw. chromatografische Verhalten der beiden Produkte nicht.

In einem weiteren Vorversuch wurde nun das Hexanucleotid- Y^+ mit 3H - $NaBH_4$ reduziert (6.4. Methode B) und mit Natronlauge vollständig hydrolysiert (6.1.5.). Die Hydrolyseprodukte wurden durch Papierelektrophorese getrennt. Dabei wurden Gm-Ap ($R_{Up} = 0.5$), Ap ($R_{Up} = 0.1$) und Pseudouridin (nicht gewandert; $R_A = 0.5$ in System A) in etwa den erwarteten Mengen gefunden. Außerdem wurde eine radioaktive Substanz mit der gleichen Beweglichkeit wie Ribit-5-phosphat nachgewiesen, die mit Perjodat

reagierte. Daraus wurde auf das Vorliegen von ^3H -Ribit-3-phosphat geschlossen.

Nachdem diese Vorversuche gezeigt hatten, daß die Methode geeignet war zum Nachweis einer Ribose mit freier Aldehydgruppe als Bestandteil eines Oligonucleotids, wurden nun zunächst die Produkte der Anilinspaltung des Hexanucleotids- γ^+ mit ^3H - NaBH_4 reduziert und säulenchromatografisch getrennt (Abb.9).

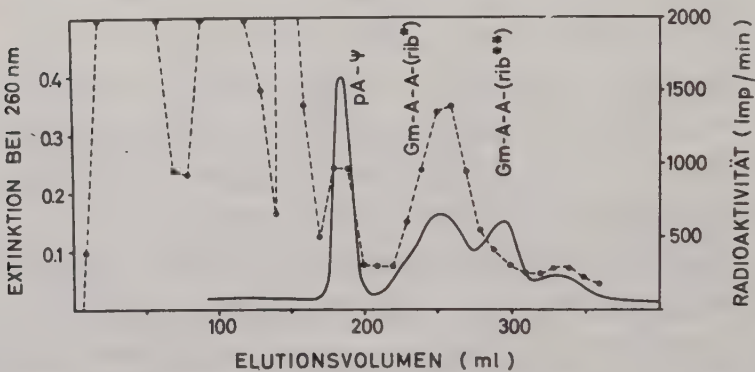


Abb.9: Chromatografische Trennung der Anilin-Spaltprodukte von Gm-A-A-Ribose-A- γ nach Reduktion mit ^3H - NaBH_4 .

25 A_{260} -Einheiten der Spaltprodukte wurden mit ^3H - NaBH_4 reduziert (6.4. Methode B) und an DEAE-Cellulose chromatografiert.

(—) Extinktion, (●----●) Radioaktivität von 0.05 ml des Eluats in 5 ml Bray-Szintillator.

Anstelle von Gm-A-A-(rib) (Vgl. Abb.8) erschienen nun zwei Substanzen, von denen nur die zuerst eluierte Radioaktivität enthielt. Die zusammen mit pA- γ eluierte Radioaktivität ließ sich durch Papierelektrophorese vollständig von pA- γ abtrennen.

In einem anderen Versuch wurde Gm-A-A-(rib) erst isoliert und

dann mit $^3\text{H-NaBH}_4$ reduziert. Auch hier erschienen bei der Chromatografie an DEAE-Cellulose anstelle von Gm-A-A-(rib) zwei Substanzen, von denen die zuerst eluierte die Radioaktivität enthielt; der Anteil der reduzierten Verbindung war bei diesem Versuch wesentlich geringer.

Das Verhalten der Verbindung Gm-A-A-(rib) bei der Reduktion läßt sich mit der Annahme deuten, daß das reduzierbare Produkt (rib) unter den Bedingungen der Reduktion (pH 8.5) zum Teil in eine nicht reduzierbare Verbindung (rib⁺⁺) umgewandelt wurde. Auch bei der Isolierung von Gm-A-A-(rib) durch Einengen der Lösung in Ammoniumcarbonatpuffer, pH 8.5, könnte eine derartige Umwandlung stattgefunden haben. Dadurch fände die geringe Menge des reduzierten Produkts, die nach der Reduktion des isolierten Gm-A-A-(rib) erhalten worden war, eine Erklärung. Die verzögerte Elution von Gm-A-A-(rib⁺⁺) bei der Chromatografie an DEAE-Cellulose deutet darauf hin, daß das Produkt eine negative Ladung mehr als Gm-A-A-(rib) und Gm-A-A-(rib⁺) aufweist.

Nach der Totalspaltung des reduzierten Produkts Gm-A-A-(rib⁺) mit Natronlauge (6.1.5.) wurden die Produkte auf Papier in System B chromatografiert. Das UV-absorbierende Material und ein Teil der Radioaktivität blieben dabei an der Startzone, während eine radioaktive Substanz, die keine UV-Absorption zeigte, wanderte ($R_A = 1.25$; Ribit: $R_A = 1.35$). Auch bei der Rechromatografie in System C verhielt sich diese Substanz ($R_F = 0.51$) anders als Ribit ($R_F = 0.65$). Bei der elektrophoretischen Auftrennung des Materials von der Startzone des Chromatogramms trat neben wenig ungespaltenem Gm-A-A-(rib⁺) ($R_{Up} = 0.15$ bei pH 2.7) ein UV-absorbierender, radioaktiver

Fleck auf ($R_{Up} = 0.5$). Dieses Material ließ sich durch Chromatografie in System D auftrennen in eine zweite radioaktive Substanz ohne UV-Absorption, die eine andere Beweglichkeit als Ribit hatte, in eine radioaktive Substanz mit dem UV-Spektrum von Adenosin, aber anderer Beweglichkeit, und in Gm-Ap. Eine mögliche Deutung für die beobachteten Produkte ergibt sich aus der Annahme, daß das bei der Anilinspaltung von Gm-A-A-Ribose-A- γ aus der Ribose entstandene Produkt (rib) mit $^3\text{H-NaBH}_4$ unter Bildung verschiedener Produkte (rib $^+$) reagierte. Die alkalische Hydrolyse von Gm-A-A-(rib $^+$) führte dann zur Bildung von Gm-Ap und heterogenem A-(rib $^+$), von dem nur ein geringer Teil zu Ap, das nicht nachgewiesen wurde, und zwei verschiedenen radioaktiven Produkten (rib $^+$) hydrolysiert wurde. Von diesen hat eines ähnliche, aber sicher nicht gleiche, chromatografische Eigenschaften wie Ribit. Die Tatsache, daß kein $^3\text{H-Ribit}$ nachgewiesen werden konnte, läßt jedenfalls den Schluß zu, daß sich am 3'-Ende von Gm-A-A-(rib) keine Ribose befand. Einen Hinweis auf die chemische Konstitution des Produktes (rib) gab das Ergebnis der Reduktion von Gm-A-A-(rib) mit $^3\text{H-NaBH}_4$.

Um aus den Ergebnissen der beiden Abbauprobe Rückschlüsse auf den Ablauf der Kettenspaltung mit Anilin ziehen zu können, wurde noch untersucht, ob eine evtl. zunächst gebildete 3'-endständige Ribose durch Reaktion mit Anilin umgewandelt wird. Die Untersuchung der Produkte, die sich aus Ribose-5-phosphat unter den Bedingungen der Anilinspaltung bilden, sollte diese Frage klären.

2.1.1.6. Umsetzung von Ribose-5-phosphat mit Anilin.

Ribose-5-phosphat wurde unter Standard-Bedingungen mit Anilin behandelt. Nachdem freies Anilin durch mehrmalige Extraktion des Reaktionsgemisches mit Äther entfernt worden war, wurden die Produkte 4 Std. bei pH 2.9, 37° inkubiert, um evtl. gebildete Schiff'sche Basen oder N-Glykoside zu hydrolysieren. Bei der Papierelektrophorese (pH 2.7) konnte nur ein Produkt nachgewiesen werden, das die gleiche Beweglichkeit wie Ribose-5-phosphat hatte ($R_{Up} = 1.3$).

Eine Ribose als Endgruppe von Gm-A-A-(rib) bzw. von Phe 1-36 würde demnach unter den Bedingungen der Anilinspaltung nicht verändert. Da bei den Abbauversuchen keine Ribose gefunden wurde, scheidet damit die Hydrolyse als möglicher Ablauf der Spaltung der $tRNA^{Phe}(HCl)$ mit Anilin aus. Als wahrscheinlichste von den denkbaren Möglichkeiten (Abb.7) bleibt die β -Eliminierung.

2.1.2. Diskussion. Mechanismus der Spaltung der $tRNA^{Phe}(HCl)$ mit Anilin.

Die basenkatalysierte Spaltung von Nucleinsäuren, die Zuckerreste mit freien Aldehydgruppen enthalten, verläuft unter Spaltung der Phosphorsäureesterbindung am C-Atom(3) des freien Zuckers. Aus diesem Befund schlossen einige Autoren, daß die Reaktion nach einem β -Eliminierungsmechanismus abläuft. Für die Spaltung mit Alkali kann dieser Ablauf als wahrscheinlich gelten, da bei der Untersuchung von Modells-substanzen die er-

warteten Produkte nachgewiesen wurden. So geht Ribose-3-phosphat bei alkalischem pH unter Abspaltung von Phosphorsäure in 2,4,5-Trihydroxyvaleriansäure über (51). Die Disproportionierung eines 2-Ketoaldehyds, des erwarteten Eliminierungsproduktes, zur 2-Hydroxysäure unter alkalischen Bedingungen ist bekannt (52). Auch die Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-phosphat mit Alkali, die über Brenztraubenaldehyd zur Milchsäure führt (53), verläuft wohl über eine Eliminierung der Phosphorsäure und anschließende Disproportionierung des Ketoaldehyds.

Die Amin-katalysierte Spaltung von tRNA an den Positionen abgespaltener Uracilbasen wurde ebenfalls als β -Eliminierung gedeutet, ohne daß jedoch das bei der Eliminierung der Phosphorsäure aus der Ribose entstehende Produkt untersucht worden war (26,50,54). Die Ergebnisse der in 2.1.1. beschriebenen Versuche machen die β -Eliminierung sehr wahrscheinlich. Zwei Befunde sind aber mit einem Mechanismus, bei dem die Amine nur die Rolle von Basen spielen, die durch Abspaltung des Protons vom C-Atom(2) der Ribose die Eliminierung des Phosphats einleiten, nicht vereinbar: 1) Von den drei Aminen Anilin, N-Methylanilin und N,N-Dimethylanilin, die alle pK-Werte um 5 haben, bewirkte das tertiäre keine Spaltung der tRNA^{Phe}(HCl); 2) die Spaltung mit Anilin verlief bei pH 5 und 3.5 wesentlich schneller als bei pH 7, obwohl die Konzentration der freien Base bei den sauren pH-Werten stark herabgesetzt ist. Es ist außerdem unwahrscheinlich, daß die Aldehydgruppe den Wasserstoff am C-Atom(2) der Ribose ausreichend stark aktiviert, daß er durch die relativ schwach basischen aromatischen Amine als Proton abgespalten werden kann.

Für die Umsetzung von Phenylglycerinaldehyd mit Anilin bei saurem pH, die zur Bildung von Benzylglyoxyal führt, wurde ein Reaktionsmechanismus angegeben, bei dem der Eliminierung der OH-Gruppe die Bildung einer protonierten Schiff'schen Base vorausgeht (55). In Anlehnung daran läßt sich für den vorliegenden Fall ein β -Eliminierungsmechanismus formulieren, der den Befunden dieser Arbeit Rechnung trägt (Abb. 10). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist hier die Protonierung und Wasserabspaltung, die das zunächst durch Addition des Amins an (I) gebildete Carbinolamin (II) in das Kation

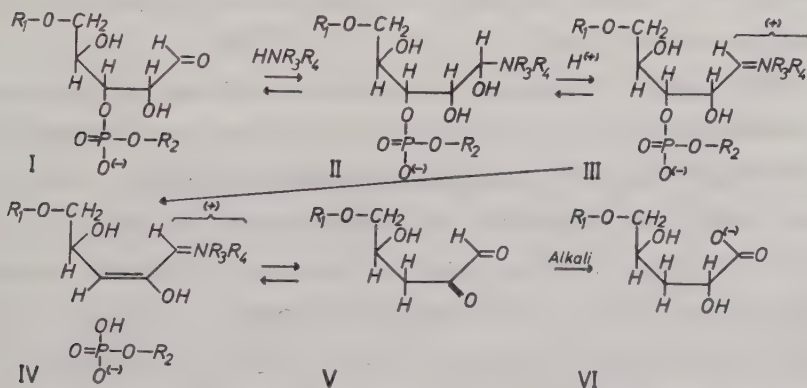


Abb. 10: Ablauf der β -Eliminierung bei der Spaltung der tRNA^{Phe}(HCl) und des Hexanucleotids-Y⁺ mit Anilin und N-Methylanilin.

R_1 und R_2 deuten die Fortsetzung der RNA-Kette zum 5'- bzw. 3'-Ende an. Anilin: R_3 = Phenyl, R_4 = H; N-Methylanilin: R_3 = Phenyl, R_4 = Methyl.

einer Schiff'schen Base (III) überführt. In (III) ist das Proton am C-Atom(2) der Ribose soweit aktiviert, daß seine Abspaltung durch ein zweites Molekül des Amins die Eliminierung des Phosphorsäureesters einleiten kann. Das primär gebildete Enol

(IV) geht dann unter Tautomerisierung und Hydrolyse in den 2-Ketoaldehyd (V) über, der das Endprodukt der Eliminierung ist. Tertiäre Amine können nicht in dieser Weise reagieren. Eine ähnliche Reaktionsfolge wurde kürzlich für die Abspaltung der Phosphorsäure aus perjodatoxidiertem Adenosin-5'-phosphat mit Methylamin vorgeschlagen (56).

Im Enol (IV) ist das Proton am C-Atom(4) möglicherweise aktiviert, so daß eine zweite Eliminierung des Phosphorsäureesters vom C-Atom(5) denkbar erscheint (vgl. auch Abb.7). Bei der Spaltung mit p-Anisidin scheint diese Reaktion stattzufinden, wie aus der Bildung von zwei endständigen Phosphatgruppen geschlossen wurde (50).

Die oben erwähnte Disproportionierung von 2-Ketoaldehyden zu 2-Hydroxysäuren kann die bei der Reduktion der Spaltprodukte des Hexanucleotids- Y^+ erhaltenen Ergebnisse verständlich machen: Unter den Bedingungen der Reduktion mit $^3H-NaBH_4$ (pH 8.5) findet die Disproportionierung des 2-Keto-4,5-dihydroxyvaleraldehyds (rib) zur 2,4,5-Trihydroxyvaleriansäure (rib $^{++}$) in Konkurrenz zur Reduktion statt, so daß nur ein Teil zu 1,2,4,5-Tetrahydroxypentan (rib $^+$) reduziert werden kann. Die Carbonsäure ist nicht mit $NaBH_4$ reduzierbar. Ihre negative Ladung (bei pH 8.5) erklärt die verzögerte Elution von Gm-A-A-(rib $^{++}$) bei der Chromatografie an DEAE-Cellulose (Abb.9).

2.1.3. Basenkatalysierte Spaltung nach der Abspaltung von 7-Methylguanin.

Bei der Behandlung eines bestimmten $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ -Präparates mit Anilin wurde neben den Halbmolekülen ein weiteres Fragment gebildet. Aus der Beweglichkeit bei der analytischen Disk-Elektrophorese wurde eine Kettenlänge von 26-30 Nucleotiden bestimmt. Die $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ war aus einer tRNA^{Phe} hergestellt worden, in der die Base Y^+ nicht intakt war; ihr chromatografisches Verhalten ließ darauf schließen, daß sie der Einwirkung von Alkali ausgesetzt gewesen war (12). Von den anderen Nucleosiden der tRNA^{Phe} ist eine Reaktion mit Alkali nur für 1-Methyladenosin, das dabei in 6-Methyladenosin übergeht, und 7-Methylguanosin bekannt. Aus m^7G entsteht bei der Einwirkung von Alkali unter Öffnung des Imidazolringes 2-Amino-6-hydroxy-5-methylformamido-4-ribosylaminopyrimidin (57), vgl. Abb. 11, A.

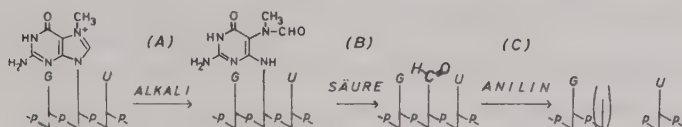


Abb. 11: Reaktionsschema für die Umwandlung des 7-Methylguanosins und die Spaltung der Nucleotidkette.

Ausgehend von der bekannten Säurelabilität der N-Glykoside aromatischer Amine konnte auch für diese Verbindung eine säurelabile Glykosidbindung vermutet werden. Bei der zur Abspaltung von Y^+ durchgeführten Behandlung der tRNA^{Phe} mit Säure sollte das 4-Ribosylaminopyrimidin-Derivat ebenfalls hydrolysiert

werden (Abb. 11,B). Bei der Behandlung mit Anilin sollte dann auch an dieser Position eine Spaltung der Nucleotidkette stattfinden (Abb. 11, C). Das entstehende Fragment hätte eine Kettenlänge von 30 Nucleotiden (Phe 47-76), in Übereinstimmung mit der beobachteten elektrophoretischen Beweglichkeit. Der betroffene Bereich der tRNA^{Phe}, die S-Region, ist der enzymatischen Spaltung durch kontrollierte Einwirkung von Endonucleasen nicht zugänglich, so daß eine chemische Spaltung an der Position des m⁷G besondere Bedeutung hätte. Außerdem sollte die Reaktion auch auf andere tRNAs, die m⁷G enthalten, anwendbar sein.

2.1.3.1. Umwandlung des freien 7-Methylguanosins durch Behandlung mit Alkali. Nachweis der Säurelabilität des Produktes.

Freies m⁷G wurde durch sechsstündige Inkubation bei pH 9.5 und 37° praktisch vollständig in das 4-Ribosylaminopyrimidin-Derivat umgewandelt. Die Reaktion wurde durch Messung der UV-Spektren verfolgt (57). Das Produkt konnte auch durch Dünnschichtchromatografie nachgewiesen werden (Tabelle 3). Durch eine Inkubation bei pH 3 wurde das 4-Ribosylaminopyrimidin-Derivat teilweise gespalten in Ribose und ein Produkt (2,4-Diamino-6-hydroxy-5-methylformamidopyrimidin), das ähnliche chromatografische Eigenschaften wie 7-Methylguanin hatte (Tabelle 3). Offenbar war die erwartete hydrolytische Spaltung der N-glykosidischen Bindung des 4-Ribosylaminopyrimidin-Derivats eingetreten. Eine Säurebehandlung des m⁷G ohne vorherige

	R_F -Wert	Absorption	Fluoreszenz	Reaktion mit Per- jodat
m^7G	0.1		+	+
m^7G (Alkali)	0.5	+	-	+
Produkte der	0.5	+	-	+
Säurebehandlung	0.37	+	-	-
von m^7G (Alkali)	0.66	-	-	+
7-Methylguanin	0.36	+	-	-
Ribose	0.66	-	-	+

Tabelle 3: Trennung der Produkte der Alkali- und Alkali/
Säure-Behandlung von m^7G durch Dünnschicht-Chromatografie.

0.5 μ Mol m^7G wurden in 0.1 ml 0.025M $(NH_4)_2CO_3$, pH 9.5,
6 Std. bei 37° inkubiert. Nach dem Eintrocknen im Vakuum
über P_2O_5/KOH wurde ein Teil des Produkts in 0.05 ml 0.025M
 NH_4 -Formiat, pH 2.9, 4Std. bei 37° inkubiert. Nach mehrfa-
chem Eintrocknen wurden die Produkte in Wasser aufgenommen
und durch Chromatografie auf einer Cellulose-Dünnschichtplatte
in System E getrennt. Zum Zuckernachweis mit Perjodat/Benzidin
s. 6.11.

Inkubation mit Alkali veränderte dessen Fluoreszenz und chroma-
tografisches Verhalten nicht.

2.1.3.2. Analytischer Nachweis der Spaltung der $tRNA^{Phe}(HCl)$,
 $tRNA^{Phe}$ und des Fragments Phe 38-76 an der m^7G -Position.

In der nativen Struktur der $tRNA^{Phe}$ ist m^7G gegen den Angriff
chemischer Reagentien abgeschirmt (58). Um trotzdem eine Um-
wandlung durch Einwirkung von Alkali zu erreichen, wurden Be-
dingungen angewendet, bei denen die $tRNA$ in der ungeordneten
Knäuelform vorliegt: Abwesenheit von Mg^{++} und hohe Temperatur
(50°); vgl. dazu die Schmelzkurven der $tRNA^{Phe}$ in 4.1. und

4.2. Mg^{++} -Ionen wurden aus den untersuchten tRNAs durch intensive Dialyse entfernt (6.2.). Die der Alkalibehandlung folgende Hydrolyse mit Säure und die anschließende Reaktion mit Anilin (B und C in Abb. 11) wurden zu einer Anilinbehandlung bei pH 3-3.5 zusammengefaßt (6.1.2.). Wie die Analyse durch Disk-Elektrophorese zeigte, entstanden aus $tRNA^{Phe}(HCl)$ bei Anwendung der beiden Reaktionen, Alkali- und saure Anilinbehandlung, neben Halbmolekülen das oben erwähnte Fragment mit $R_B = 0.37$ (Phe 47-76, vgl. 2.1.3.4.) und ein kurzes Fragment mit $R_B = 0.82$ (Phe 38-45, vgl. 2.1.3.4.) in hoher Ausbeute (Abb. 12a). Die gleichen Fragmente wurden (in etwas höherer Ausbeute) bei der Umsetzung des Fragments Phe 38-76 erhalten (Abb. 12b); das Halbmolekül Phe 38-76 aus Weizen $tRNA^{Phe}$ ergab ein analoges Bild. Abb. 12c zeigt das Ergebnis der Reaktion mit $tRNA^{Phe}$ (wegen der Säurelabilität des Y wurde hier die Anilinbehandlung bei pH 5 durchgeführt): Die Spaltung an der m^7G -Position führte hier zur Bildung von Phe 47-76 und einem Fragment, das größer als Halbmoleküle war; es handelte sich wohl um das erwartete Fragment Phe 1-45. Ein Fragment gleicher Größe wurde erhalten (Abb. 12d), wenn die freie Ribose in $tRNA^{Phe}(HCl)$ vor der Umsetzung mit Alkali und Anilin zu Ribit reduziert worden war, da dann die Spaltung in Halbmoleküle nicht stattfindet (vgl. 2.1.1.1.). Der, verglichen mit der Menge des Fragments Phe 47-76, niedrige Anteil des Fragments Phe 1-45(- Y^+) ist vermutlich auf eine ähnliche Spaltung mit Anilin an den Positionen von teilweise ebenfalls reduziertem Dihydrouracil (48,59) zurückzuführen, die kürzlich beschrieben wurde (40). Für diese Möglichkeit spricht auch das Auftreten

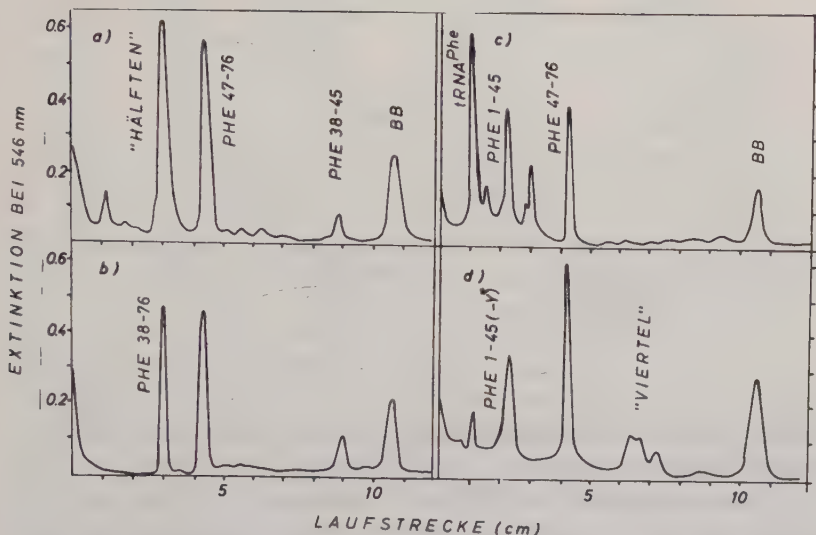


Abb. 12: Densitogramme der disk-elektrophoretischen Trennung von Alkali/Anilin-behandelter a) tRNA^{Phe} (HCl), b) Phe 38-76, c) tRNA^{Phe} und d) NaBH_4 - reduzierter (6.4. Methode A) tRNA^{Phe} (HCl). Reaktionsbedingungen wie in 6.1.2., außer daß bei c) die Anilinbehandlung bei pH 5 durchgeführt wurde.

von tRNA-Bruchstücken im Größenbereich von Viertelmolekülen auf der Disk-Elektrophorese (vgl. dazu auch 2.1.3.5.).

In allen Fällen waren die tRNAs nach der Inkubation mit Alkali intakt. Die Fragmente wurden erst durch die Behandlung mit Anilin gebildet. tRNA^{Ser} und das Fragment Phe 1-36, die beide kein $m^7\text{G}$ enthalten, blieben bei der Behandlung mit Alkali und Anilin intakt.

Die Abhängigkeit der Ausbeute an Fragmenten von der Dauer der Alkalibehandlung wurde mit tRNA^{Phe} (HCl) untersucht (Abb.13). Weitere Versuche zeigten, daß eine Inkubation der mit Alkali behandelten tRNA^{Phe} (HCl) mit Säure vor der Anilinbehandlung

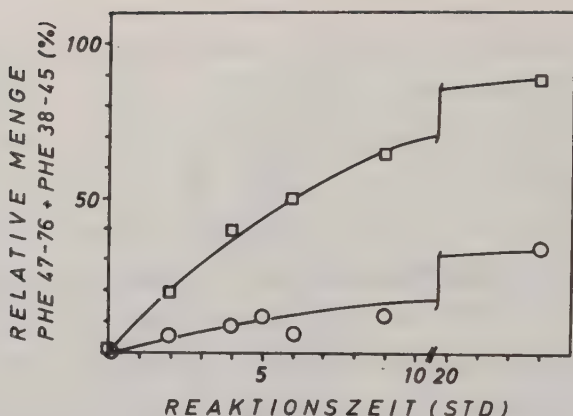


Abb.13: Kinetik der Alkaliumwandlung des 7-Methylguanosins in $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$.

10 A_{260} -Einheiten/ml $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ wurden bei 50° in 0.1M Tris-HCl bei pH 8 (○-○) und pH 9.5 (□-□) inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquots auf pH 5 gebracht und mit Äthanol gefällt. Nach Anilinbehandlung (6.1.2.) wurden die Spaltprodukte disk-elektrophoretisch getrennt. Das Ausmaß der Spaltung wurde durch quantitative Auswertung der Densitogramme bestimmt.

keine Erhöhung der Ausbeute bewirkte, so daß die Kombination der Inkubation mit Säure und Anilin gerechtfertigt war.

2.1.3.3. Spaltung der $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ an den Positionen von $m^7\text{G}$ und Y. Isolierung der Produkte.

Die durch Behandlung der $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ mit Alkali und Anilin erhaltenen Produkte (6.1.2.) wurden säulenchromatografisch getrennt (Abb.14a). Das Fragment Phe 38-45, das auf Grund seiner elektrophoretischen Beweglichkeit ($R_B = 0.82$) identifiziert wurde, wurde bei verschiedenen Aufarbeitungen in

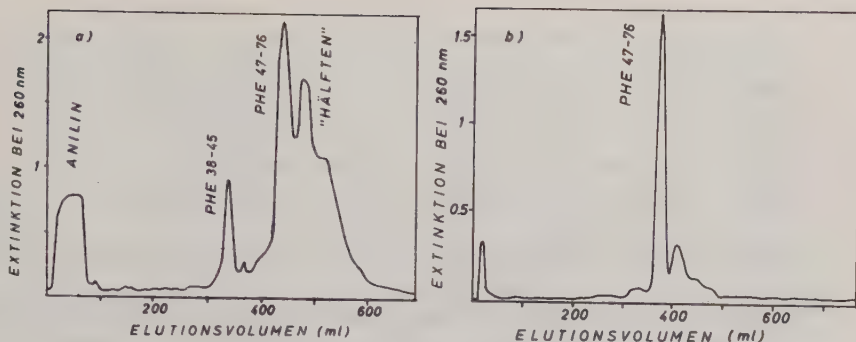


Abb. 14: Isolierung der Produkte der Alkali/Anilin-Behandlung der $tRNA^{Phe}(HCl)$.

a) Etwa 250 A_{260} -Einheiten der Spaltprodukte (6.1.2.) wurden in 100 ml 7M Harnstoff, pH 5, auf eine DEAE-Cellulose-Säule (1 x 100 cm) aufgetragen. Eluiert wurde mit einem Gradienten von je 300 ml 0.1 und 0.6M NaCl in 0.01M Na-Acetat, 7M Harnstoff, pH 5.

b) Rechromatografie der Fraktion mit Phe 47-76 aus a) auf einer DEAE-Sephadex A25-Säule (0.5 x 70 cm). Der Gradient bestand aus je 400 ml 0.1 und 0.5M NaCl in 7M Harnstoff, pH 3.

40-65 % Ausbeute (bezogen auf eingesetzte $tRNA^{Phe}(HCl)$) rein erhalten. Durch Rechromatografie des Materials aus dem folgenden Gipfel wurde das Fragment Phe 47-76 in ähnlichen Ausbeuten isoliert (Abb. 14b).

2.1.3.4. Oligonucleotidanalyse des Fragments Phe 47-76.

Die Produkte der vollständigen Spaltung des Fragments Phe 47-76 mit T_1 -RNase wurden an DEAE-Cellulose chromatografiert; Abb.15 zeigt das Elutionsprofil. Die Oligonucleotide wurden anhand ihrer R_{Up} -Werte auf der Papierelektrophorese und durch Vergleich ihrer UV-Spektren mit den von RajBhandary et al. (60) angegebenen identifiziert. Die Ergebnisse der quantitativen

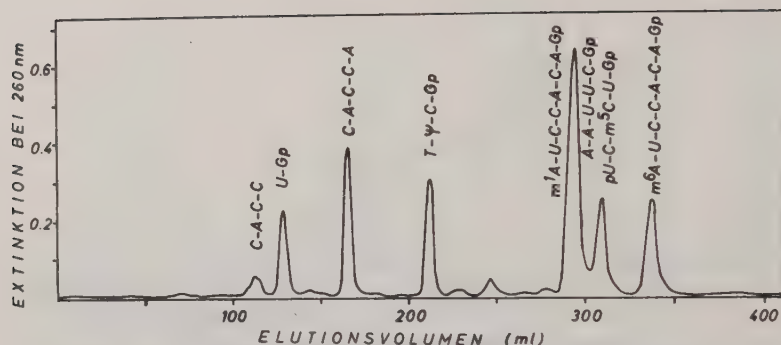


Abb. 15: Chromatografie eines T_1 -RNase-Hydrolysats des Fragments Phe 47-76.

12 A_{260} -Einheiten Phe 47-76 wurden mit 100 Einheiten T_1 -RNase vollständig gespalten (6.6.2.) und an DEAE-Cellulose chromatografiert (6.7.1.).

Oligonucleotid	R_{Up} (pH 2.7)	rel. Menge
C-A-C-C	- 0.13	0.25
U-Gp	1.01	1.1
C-A-C-C-A	- 0.07	0.85
T-Y-C-Gp	1.05	1.00
m^1A -U-C-C-A-C-A-Gp	0.90	0.72
A-A-U-U-C-Gp	0.87	0.98
pU-C- m^5C -U-Gp	1.15	0.95
m^6A -U-C-C-A-C-A-Gp	0.55	0.27

Tabelle 4: Quantitative Auswertung der Oligonucleotidanalyse von Phe 47-76 (Abb. 15).

Zur Berechnung wurden die Extinktionskoeffizienten von RajBhandary et al. (60) übernommen oder ähnlich abgeschätzt. Die erhaltenen molaren Mengen sind relativ zur Menge an T-Y-C-Gp angegeben. Zur C_H Charakterisierung von pU-C- m^5C -U-Gp s. Text.

Auswertung sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Das Oligonucleotid $pU-C-m^5C-U-Gp$ wurde mit Pankreas-RNase gespalten (6.6.1.). Die einzelnen Nucleotide konnten durch ihre R_{Up} -Werte und UV-Spektren identifiziert werden. Die aus Cp und m^5Cp durch Behandlung mit PME (6.5.) erhaltenen Nucleoside wurden durch Chromatografie in System A getrennt. Die Menge des, schon von RajBhandary et al. beobachteten Oligonucleotids $m^6A-U-C-C-A-C-A-Gp$ zeigte, daß bei der Behandlung der $tRNA^{Phe}(HCl)$ mit Alkali auch etwa ein Drittel des m^1A in m^6A umgewandelt worden war.

Durch die eindeutige Charakterisierung eines der Fragmente als Phe 47-76 ist die Spaltung der $tRNA^{Phe}(HCl)$ an der m^7G -Position bewiesen. Die Tatsache, daß Phe 47-76 ein 5'-endständiges Phosphat trägt, zeigt, daß die Spaltung mit Anilin wie die für die Y-Position beschriebene über eine β -Eliminierung verläuft.

Das Fragment Phe 38-45, das bei der Spaltung der $tRNA^{Phe}(HCl)$ am m^7G neben Halbmolekülen und Phe 47-76 erhalten wurde, trat nicht auf, wenn die Spaltung an der Y-Position nicht möglich war, dh. bei der Spaltung der $tRNA^{Phe}$ (Abb. 12c) und der reduzierten $tRNA^{Phe}(HCl)$ (Abb. 12d) an der m^7G -Position. Es handelte sich demnach sehr wahrscheinlich tatsächlich um das Oktanucleotid $pA-Y-m^5C-U-G-G-A-G-(rib)$, das durch die gleichzeitige Spaltung der $tRNA^{Phe}(HCl)$ an den Positionen von m^7G und Y gebildet werden sollte. Die gleiche Argumentation gilt für die Zuordnung der Fragmente Phe 1-45 und Phe 1-45($-Y^+$).

2.1.3.5. Spaltung reduzierter tRNA^{Phe}(HCl) an der m⁷G-Position. Isolierung der Produkte.

Die Reduktion der freien Aldehydgruppe in tRNA^{Phe}(HCl) verhinderte die Spaltung mit Anilin an dieser Stelle (vgl. 2.1.1.1.). Die Spaltung an der Position des m⁷G lieferte dann die Fragmente Phe 47-76 und Phe 1-45(-Y⁺) (Abb. 12d).

Zur Darstellung größerer Mengen dieser Fragmente wurde tRNA^{Phe}(HCl) mit NaBH₄ reduziert (6.4. Methode A) und durch Behandlung mit Alkali und Anilin an der m⁷G-Position gespalten (6.1.2.). Die Trennung der Produkte durch Säulenchromatografie an DEAE-Sephadex A25 (7 M Harnstoff, pH 3) gelang nicht vollständig, da sich intakte tRNA nicht von Phe 1-45(-Y⁺) abtrennen ließ. Mit Hilfe der präparativen Disk-Elektrophorese konnten die Produkte rein isoliert werden (6.10.). Das Fragment Phe 1-45(-Y⁺) konnte bei manchen Präparationen nur in niedrigen Ausbeuten isoliert werden. Die Disk-Elektrophorese zeigte, daß noch eine Reihe anderer Fragmente gebildet worden war (vgl. Abb. 12c). Offenbar wurde unter den angewendeten Reduktionsbedingungen (pH 7.5, 25°) immer noch ein beträchtlicher Teil der Dihydrouracilbasen reduziert, obwohl zu ihrer schnellen, vollständigen Reduktion pH 9.8 notwendig ist (47,59). Die Anilinspaltung an den Positionen des reduzierten hU (40) vermindert die Ausbeute des Fragments Phe 1-45(-Y⁺). Die Ausbeute ließe sich sicher erhöhen, wenn man zur Reduktion der tRNA^{Phe}(HCl) Bedingungen anwendete, unter denen hU nicht angegriffen wird. Die Schiff'schen Basen aus tRNA^{Phe}(HCl) und primären aromatischen Aminen konnten unter Bedingungen (pH 7.5, 0°) reduziert werden, die hU praktisch völlig intakt

ließen (vgl. 3.4.). Die Aldehydgruppe in $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ sollte sich unter ähnlich milden Bedingungen reduzieren lassen.

2.2. Spezifische Spaltung von tRNA durch alkalische Hydrolyse in Gegenwart von Mg^{++} -Ionen.

Unter stark alkalischen und stark sauren Bedingungen wird RNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen in 3'(2')-Nucleotide gespalten. Wie Dimroth et al. (61) fanden, läßt sich die Hydrolyse schneller und unter milderer Bedingungen durchführen, wenn die Hydroxide mehrwertiger Metalle zugesetzt werden. Diese katalytische Wirkung wurde für eine ganze Reihe von Metallen gezeigt (62,63). Bei der Reaktion werden, abhängig vom verwendeten Metall und von den Reaktionsbedingungen, Dinucleotide, Dinucleosidphosphate, 3'(2')-Nucleotide oder Nucleoside gebildet. Eingehende Untersuchungen der Spaltung von Poly A (64) zeigten, daß Zink die stärkste katalytische Wirkung hatte, während die Übergangsmetalle schwächer katalysierten; das pH-Optimum war um pH 7. Mg^{++} zeigte erst bei höheren pH-Werten eine schwache Wirkung. Bei der Untersuchung der Inaktivierung von Tabakmosaikvirus-RNA durch Erhitzen in Gegenwart verschiedener Metallionen wurden ähnliche Ergebnisse erhalten (65). Beim Erhitzen unfraktionierter tRNA in Gegenwart von Mg^{++} wurde eine rasche Abnahme der Akzeptoraktivität für verschiedene Aminosäuren gefunden und auf eine Spaltung der tRNA zurückgeführt (66).

Für den Ablauf der durch Metallionen katalysierten Hydrolyse

der Phosphodiesterbindungen wurde ein Mechanismus vorgeschlagen (61), der dem für die saure Hydrolyse angenommenen sehr ähnlich ist (67,68). Das Metallion übernimmt dabei die Rolle des Protons. Bei der genauen Analyse der Spaltungsprodukte wurden auch Nucleosid-2', 3'-cyclophosphate nachgewiesen, so daß der vorgeschlagene Mechanismus wahrscheinlich ist (69). Die Frage, ob bestimmte Phosphodiesterbindungen bevorzugt angegriffen werden, wurde schon früh gestellt (20). So wurde eine gewisse Spezifität für die Spaltung neben Pyrimidinnucleosiden beobachtet (70,71). In einer kürzlich erschienenen Arbeit, in der die Spaltung von Hefe-RNA mit Zn^{++} untersucht wurde, konnte diese Bevorzugung durch geeignete Reaktionsbedingungen weiter erhöht werden. Dabei wurde eine erhöhte Hydrolysegeschwindigkeit für die Phosphodiesterbindungen zwischen zwei Pyrimidinnucleosiden gefunden (72). Die Spezifität, die notwendig ist, um die Methode zur Herstellung definierter RNA-Fragmente verwenden zu können, wurde allerdings nicht erreicht.

Bei der Untersuchung der Umwandlung des m^7G in tRNA^{Phe} durch Inkubation bei alkalischem pH, die im allgemeinen in Abwesenheit mehrwertiger Metallionen durchgeführt worden war (vgl. 2.1.3.2.), wurde nun beobachtet, daß bei der Alkalibehandlung in Gegenwart von Mg^{++} -Ionen definierte tRNA-Fragmente gebildet wurden. Die im folgenden beschriebene nähere Untersuchung dieses überraschenden Effektes ergab, daß tRNA^{Phe} unter diesen Bedingungen fast völlig spezifisch in die Fragmente Phe 1-16 und Phe 17-76 gespalten wurde. $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ zeigte ein ähnliches Verhalten. Auch tRNA^{Ser} wurde spezifisch gespalten. Während

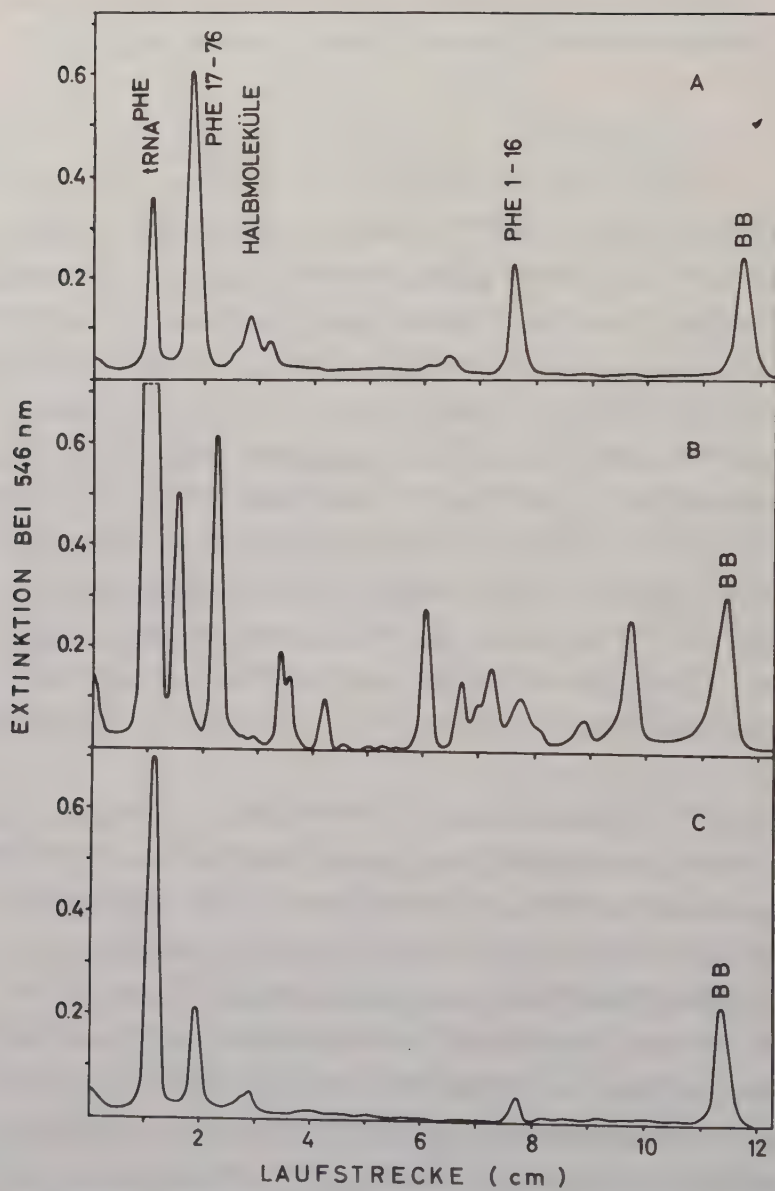
der Abfassung der vorliegenden Arbeit wurde eine ähnliche Spaltung der tRNA^{Phe} mit Pb⁺⁺-Ionen beschrieben (73).

2.2.1. Mg⁺⁺-katalysierte Spaltung der tRNA^{Phe}.

Die Spaltung der tRNA^{Phe} durch Alkalibehandlung in Gegenwart von Mg⁺⁺-Ionen wurde zunächst bei verschiedenen Mg⁺⁺-Konzentrationen untersucht. Die Fragmentgemische wurden mit Hilfe der Disk-Elektrophorese analysiert. Abhängig vom Verhältnis der Mg⁺⁺-Ionen zu den Phosphorsäureestergruppen der tRNA (Mg⁺⁺/P) wurden verschiedene Fragmentmuster erhalten. Bei einem Verhältnis Mg⁺⁺/P $\gg$ 0.5 wurde tRNA^{Phe} praktisch spezifisch in ein Fragment im Größenbereich von Viertelmolekülen (Phe 1-16, vgl. 2.2.2.) und ein großes Fragment (Phe 17-76, vgl. 2.2.2.) gespalten (Abb. 16 A). Der Anteil der Halbmoleküle betrug unter allen Bedingungen höchstens 10 %. Daneben trat immer auch ein zweites, etwas größeres Viertelfragment in geringer Menge auf.

Bei Mg⁺⁺/P-Verhältnissen, die kleiner als 0.5 waren, wurde ein vollkommen anderes Spaltmuster erhalten (Abb. 16B). Das Auftreten von definierten Fragmenten zeigte, daß die Spaltung nun mit geringerer Spezifität ablief, daß aber an den verschiedenen Positionen einheitlich gespalten wurde.

Bei der Titration von Mg⁺⁺-freier tRNA mit Mg⁺⁺-Ionen wurde durch Messung der UV-Absorption gezeigt (74,75), daß beim Erreichen eines Verhältnisses Mg⁺⁺/P = 0.5 eine Strukturänderung der tRNA eintritt. Damit lag die Vermutung nahe, daß die beobachtete Änderung des Spaltmusters beim Unterschreiten



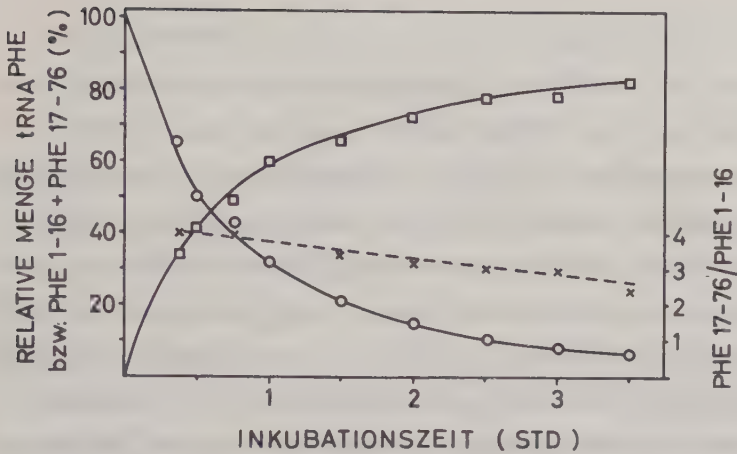


Abb. 17: Kinetik der Mg^{++} -katalysierten Spaltung der $tRNA^{Phe}$ in Phe 1-16 und Phe 17-76. 10 A_{260} -Einheiten/ml $tRNA^{Phe}$ wurden in 0.05M Tris-HCl, pH 9.5, 10 mM $MgCl_2$ ($Mg^{++}/P = 8$) bei 50° inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquots mit Essigsäure auf etwa pH 5 gebracht. Aus den Densitogrammen der disk-elektrophoretischen Trennungen wurden die relativen Mengen von $tRNA^{Phe}$ (○-○) bzw. Phe 1-16 + Phe 17-76 (□-□) und das Verhältnis Phe 17-76/Phe 1-16 (x---x) bestimmt.

Abb. 16: Densitogramme der $tRNA^{Phe}$ nach Alkalibehandlung in Gegenwart von Mg^{++} .

8 A_{260} -Einheiten/ml $tRNA^{Phe}$ (nach 6.3. von zweiwertigen Ionen befreit) wurden 3 Std. bei 50° in 0.05M Tris-HCl, pH 9.5, inkubiert mit

- A) 10 mM $MgCl_2$ ($Mg^{++}/P = 10$),
- B) 0.2 mM $MgCl_2$ ($Mg^{++}/P = 0.2$),
- C) 0.2 mM $MgCl_2$ und 1M NaCl (Suprapur, Merck).

eines Mg^{++}/P -Verhältnisses von 0.5 auf eine Konformationsänderung der $tRNA^{Phe}$ zurückzuführen war. Diese Annahme wird gestützt durch den Befund, daß beim Zusatz von 1 M NaCl zum Spaltungsansatz mit $Mg^{++}/P = 0.2$ wieder das gleiche Fragmentmuster erhalten wurde (Abb. 16C), das sonst nur bei Mg^{++}/P -Verhältnissen größer als 0.5 aufgetreten war. Das geringe Ausmaß der Spaltung erklärt sich mit der Verdrängung der Mg^{++} -Ionen von der $tRNA$ durch die in sehr hoher Konzentration vorliegenden Na^{+} -Ionen. Diese Verdrängung und die Ausbildung einer stabilen $tRNA$ -Struktur in Gegenwart hoher Na^{+} -Konzentrationen wurde am Verhalten der $tRNA^{Ala}$ aus Hefe bei der thermischen Denaturierung nachgewiesen (76).

Den zeitlichen Verlauf der Spaltung der $tRNA^{Phe}$ in die Fragmente Phe 1-16 und Phe 17-76 bei einem Verhältnis $Mg^{++}/P = 8$ zeigt Abb. 17.

Bei niedrigeren Mg^{++}/P -Verhältnissen verlief die Reaktion langsamer. Bei höheren nahm das Ausmaß des unspezifischen Abbaus zu, erkennbar am Auftreten unstrukturierter, anfärbarer Bereiche auf der Disk-Elektrophorese. Die Betrachtung des Verhältnisses der Mengen von Phe 17-76 und Phe 1-16 zeigt, daß auch beim Verhältnis $Mg^{++}/P = 8$ in gewissem Umfang unspezifischer Abbau stattfand. Unter Berücksichtigung der Kettenlängen der beiden Fragmente sollten die Flächen der entsprechenden Gipfel der Densitogramme ein Verhältnis Phe 17-76/Phe 1-16 von 3.8 bilden. Das Absinken vom anfänglichen Wert um 4 auf Werte unter 3 deutet darauf hin, daß von den beiden Fragmenten besonders Phe 17-76 (oder der entsprechende Bereich in der $tRNA^{Phe}$) unspezifisch gespalten wurde. Ein Teil des

Verlustes an Phe 17-76 läßt sich auch erklären durch eine zweite spezifische Spaltung im Anticodonbereich, die ein Viertel- und ein Halbmolekül liefern sollte; Fragmente dieser Größe wurden beobachtet (Abb. 16 A). Zur Frage des unspezifischen Abbaus geben die im Abschnitt 2.2.3. beschriebenen Versuche mit $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ näheren Aufschluß.

Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit zeigte, daß die Mg^{++} -katalysierte Spaltung der tRNA^{Phe} nur bei alkalischem pH stattfand (Abb. 18). Beim Übergang von pH 9.5 nach pH 10 nahm der unspezifische Abbau stark zu, was am Auftreten intensiv anfärbbarer Gelbereiche ohne Bandenstruktur zu erkennen war. Das geringe pH-Intervall des Übergangs macht eine Erklärung dieses Effekts mit unspezifischer alkalischer Hydrolyse wenig

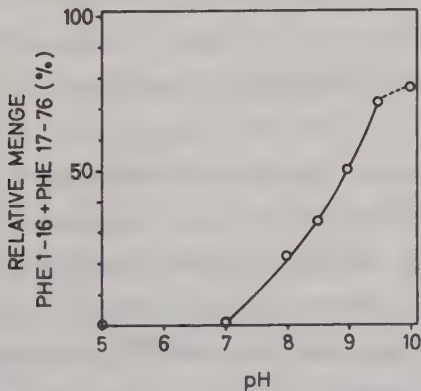


Abb. 18: pH-Abhängigkeit der Mg^{++} -katalysierten Spaltung der tRNA^{Phe} .

4 A_{260} -Einheiten/ml tRNA^{Phe} wurden in 0.05M-Tris-HCl (bei pH 5: 0.05M Na-Acetat), 10 mM MgCl_2 ($\text{Mg}^{++}/\text{P} = 20$) 4 Std. bei 50° inkubiert. Weitere Behandlung und Auswertung wie in Abb. 17.

wahrscheinlich. Eine bessere Deutung ergibt sich aus der Annahme, daß unter diesen Bedingungen (pH 10, 50°) die Struktur der tRNA teilweise geöffnet ist. Die Dissoziation von DNA-Doppelsträngen unter ähnlichen Bedingungen ist bekannt (77). Daraus ergibt sich ein weiterer Hinweis darauf, daß die Spaltung mit Mg^{++} nur dann spezifisch ist, wenn eine stabile Konformation der tRNA vorliegt.

2.2.2. Isolierung und Identifizierung der Fragmente Phe 1-16 und Phe 17-76.

Die Mg^{++} -katalysierte Spaltung der $tRNA^{Phe}$ im präparativen Maßstab ist in 6.1.3. beschrieben. Die beiden Fragmente wurden durch präparative Disk-Elektrophorese getrennt und in guter Reinheit isoliert (6.10.). Die Ausbeute (bezogen auf eingesetzte $tRNA^{Phe}$) war bei Phe 1-16 etwa 50 %, bei Phe 17-76 etwa 25 %; der Grund für die niedrige Ausbeute ist wohl eine unvollständige Elution aus dem Gel.

Die Zuordnung der Fragmente ließ sich durch Messung der Akzeptoraktivität ihrer Kombinationen mit bekannten $tRNA^{Phe}$ -Fragmenten durchführen. Die Kombinationen von Phe 1-16 mit Phe 21-76 (18) und die von Phe 17-76 mit Phe 1-15 (18) hatten etwa 50 % der Akzeptoraktivität der $tRNA^{Phe}$ (zur Durchführung des Tests vgl. 6.8.). Damit war klar, daß das Viertelfragment Phe 1-16 dem 5'-endständigen Bereich der $tRNA^{Phe}$ entstammte, und daß das große Fragment Phe 17-76 den übrigen Teil des Moleküls einschließlich des CCA-Endes umfaßte.

Die genaue Festlegung der Position in der hU-Schleife, an der die Spaltung stattgefunden hatte, gelang durch die Bestimmung des hU-Gehaltes der beiden Fragmente. Wenn das Fragment Phe 1-16

unter Bedingungen, bei denen hU reduziert wird (47,59), mit $^3\text{H-NaBH}_4$ behandelt worden war (6.4. Methode C), wurde bei der analytischen Disk-Elektrophorese eine einheitliche Bande beobachtet, die Radioaktivität enthielt. Da alle anderen Nucleotide des Fragments unter diesen Bedingungen nicht mit NaBH_4 reagieren (48), zeigte dieser Befund, daß das Fragment mindestens ein hU enthielt. Von den Nucleotiden 17-76 der tRNA^{Phe} sind mehrere reduzierbar, so daß beim Fragment Phe 17-76 der hU-Nachweis durch Messung der Extinktion bei 235 nm bei pH 13 (78) durchgeführt wurde. Mit dieser Methode wurden 0.85 Mol hU/Mol Phe 17-76 gefunden (1 A_{260} -Einheit Phe 17-76 $\hat{=}$ 2.0 nMol). Im Parallelversuch wurde für tRNA^{Phe} ein Wert von 1.7 Mol hU/Mol tRNA erhalten.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die beiden Fragmente durch eine Spaltung der Phosphodiesterbindung zwischen den beiden Dihydrouridinen in der hU-Schleife der tRNA^{Phe} gebildet wurden.

Die Beweglichkeit des Fragments Phe 1-16 bei der Disk-Elektrophorese im 16 %igen Polyacrylamidgel lag mit einem Wert von $R_B = 0.60-0.61$ zwischen denen der Fragmente Phe 1-15 ($R_B = 0.63$) und Phe 1-18 ($R_B = 0.59$) (18), die beide sowohl 5'- wie 3'-Phosphate tragen. Überträgt man den für die Spaltung von RNA mit Zn^{++} vorgeschlagenen Reaktionsverlauf (72) auf die Mg^{++} -katalysierte Spaltung, kann Phe 1-16 neben dem 5'-Phosphat ein 3'- oder 2'-Phosphat oder ein 2', 3'-Cyclophosphat besitzen. Aus der elektrophoretischen Beweglichkeit ergibt sich damit eine Kettenlänge von 15-18 Nucleotiden. Beim Fragment Phe 17-76, das kein endständiges Phosphat tragen sollte, deutet der Wert von $R_B = 0.14-0.16$ auf eine Kettenlänge von 56-60 Nucleotiden hin. Die Zuordnung der beiden Fragmente auf Grund

des Akzeptoraktivitätstests, der hU-Bestimmung und der elektrophoretischen Beweglichkeit als Phe 1-16 und Phe 17-76 erscheint damit gerechtfertigt.

2.2.3. Mg^{++} -katalysierte Spaltung der $tRNA^{Phe}(HCl)$ und der Kombination der Halbmoleküle Phe 1-36 + Phe 38-76.

Bei der Behandlung der $tRNA^{Phe}(HCl)$ mit Alkali in Gegenwart von Mg^{++} -Ionen ($Mg^{++}/P = 20$) wurde ein ähnliches Fragmentmuster wie bei $tRNA^{Phe}$ erhalten (vgl. Abb. 16 A); der Anteil der Halbmoleküle war höher. Ob die Spaltung an der freien Ribose nur auf die auch unter alkalischen Bedingungen stattfindende β -Eliminierung (vgl. 2.1.) zurückgeht, oder ob die Phosphorsäureesterbindung am C-Atom(3) der freien Ribose auch labil gegenüber der Spaltung durch Mg^{++} -Ionen ist, kann nicht sicher entschieden werden.

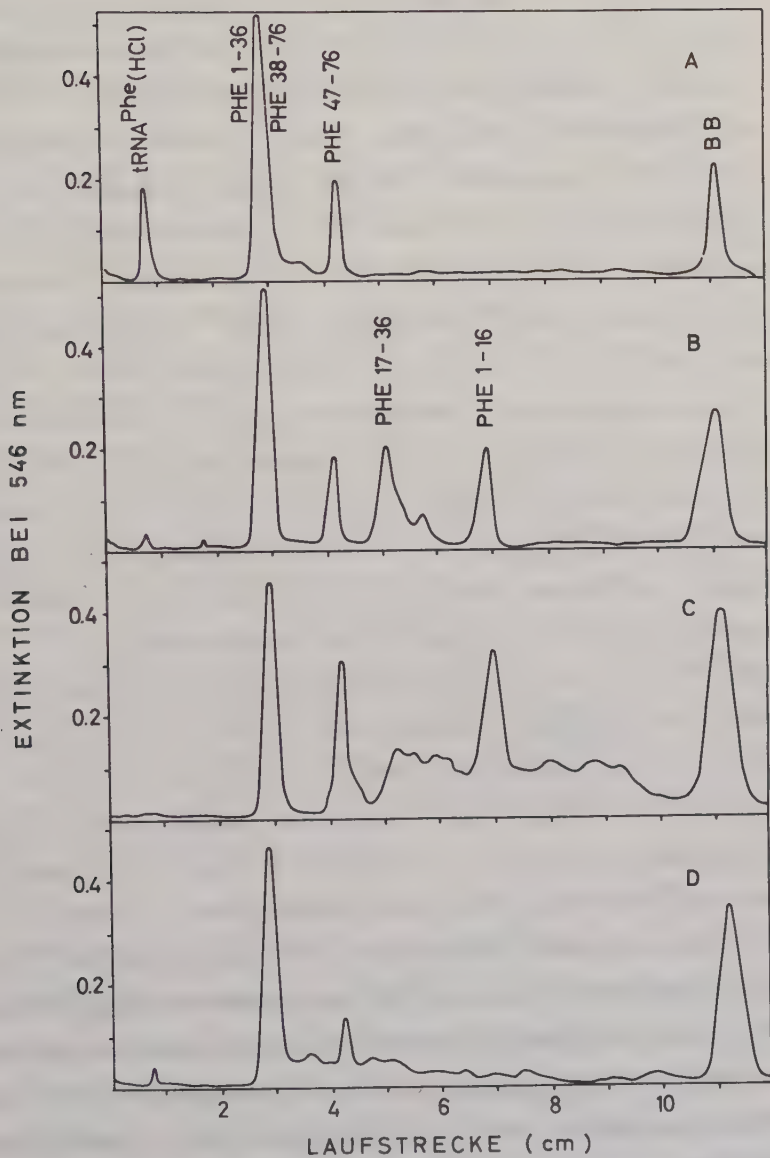
Nimmt man an, daß $tRNA^{Phe}(HCl)$ an der gleichen Stelle gespalten wird wie $tRNA^{Phe}$, die Beweglichkeiten der Fragmente sprechen dafür, so sollte bei der Spaltung das Fragment Phe 17-76($-Y^+$) entstehen. Eine Umsetzung dieses Fragments mit Anilin sollte unter Spaltung an der Y-Position das Halbmolekül

Abb. 19: Densitogramme der $tRNA^{Phe}(HCl)$ nach Alkalibehandlung und Anilinspaltung.

5.5. A_{260} -Einheiten/ml $tRNA^{Phe}(HCl)$ (nach 6.3. von zweiwertigen Ionen befreit) wurden in 0.05M Tris-HCl, pH 9.5, bei 50° inkubiert wie folgt:

A) ohne Mg^{++} , 2 Std.; B) mit 10 mM $MgCl_2$ ($Mg^{++}/P = 15$), 2 Std.; C) wie B, jedoch 4 Std.; D) wie B, jedoch unter Zusatz von 7M Harnstoff.

Nach Ansäuern und Alkoholfällung wurden alle Proben mit Anilin behandelt (6.1.1.) und auf Disk-Elektrophorese getrennt.



Phe 38-76 und das Fragment Phe 17-36 liefern. Entsprechende Versuche, bei denen die Produkte der unter verschiedenen Bedingungen durchgeführten Alkalibehandlung der $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ mit Anilin umgesetzt wurden, zeigt Abb. 19. Wurde die Inkubation mit Alkali in Abwesenheit von Mg^{++} -Ionen vorgenommen, so ergab sich nach der Anilinbehandlung das Fragmentmuster der Spaltung an der m^7G -Position (Abb. 19 A). Dagegen lieferten die Alkalibehandlung in Gegenwart von Mg^{++} und die anschließende Reaktion mit Anilin das Fragmentmuster der Abb. 19 B. Die elektrophoretische Beweglichkeit des neu auftretenden Fragments entsprach der für das Fragment Phe 17-36 erwarteten. Wurde nun länger mit Alkali und Mg^{++} inkubiert, so verschwand die Bande des Fragments Phe 17-36 unter Bildung nicht auflösender, anfärbbarer Zonen auf dem Gel (Abb. 19 C). Offenbar wurde das Fragment oder der entsprechende Bereich der $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ oder des Fragments Phe 17-76 ($-\text{Y}^+$) schneller als die anderen Fragmente unspezifisch gespalten, wie es auch schon bei der Spaltung der tRNA^{Phe} beobachtet worden war (vgl. 2.2.2.). Zusatz von 7 M Harnstoff unter sonst gleichen Bedingungen wie in Abb. 19 B brachte das Muster der spezifischen Mg^{++} -Spaltung völlig zum Verschwinden und führte zu verstärktem unspezifischen Abbau. Beim Ansatz ohne Mg^{++} bewirkte der Zusatz von Harnstoff keine Änderung gegenüber der Abb. 19 A. Aus diesen Befunden geht hervor, daß die Spaltung mit Mg^{++} völlig unspezifisch abläuft, wenn die Struktur der tRNA aufgelöst ist, was in 7 M Harnstoff bei 50° sicher der Fall ist.

Diese Deutung wird noch gestützt durch einen Versuch, bei dem die Fragmentkombination Phe 1-36 + Phe 38-76 und die ein-

zelnen Fragmente unter den Bedingungen der Abb. 19 C mit Alkali und Mg^{++} behandelt wurden. Dabei wurden die getrennten Halbmoleküle vollständig abgebaut, ohne daß auf der Disk-Elektrophorese definierte Banden erschienen. Wurde dagegen das Gemisch der Halbmoleküle analog behandelt, so trat bei der Disk-Elektrophorese das Fragment Phe 1-16 deutlich auf. Phe 17-36 wurde nicht beobachtet; es wurde offenbar auch in diesem Fall schneller als die anderen Fragmente unspezifisch gespalten. In der Mischung der Halbmoleküle wurde Phe 38-76 nur wenig angegriffen.

Die im Kapitel 4 beschriebene Untersuchung der thermischen Denaturierung des Gemischs der Halbmoleküle zeigte, daß die beiden Halbmoleküle sich vereinigen unter Ausbildung einer Struktur, die der Struktur der nativen $tRNA^{Phe}$ ähnlich ist. In Gegenwart von Mg^{++} ist das Assoziat auch noch bei 50° stabil. Die Tatsache, daß nur die Kombination der Halbmoleküle bei der Behandlung mit Alkali und Mg^{++} spezifisch gespalten wurde, zeigt noch einmal, daß die Spezifität der Spaltung vom Vorliegen einer stabilen Konformation der $tRNA$ bzw. der Fragmentkombination abhängt.

2.2.4. Mg^{++} -katalysierte Spaltung der $tRNA^{Ser}$.

Wurde $tRNA_{I/II}^{Ser}$ in Gegenwart von Mg^{++} -Ionen bei pH 9.5 inkubiert, entstanden auch bei dieser $tRNA$ durch spezifische Spaltung definierte Fragmente (Abb. 20). Wahrscheinlich sind die Fragmente I und VI durch eine Spaltung in der hU-Region entstanden. Die Fragmente II und IV haben ähnliche Kettenlängen wie die beiden durch enzymatische Spaltung im Anticodon der

tRNA^{Ser} erhaltenen Fragmente (unveröffentlichte Versuche von F. Fittler), so daß sie wohl durch eine Spaltung in diesem Bereich gebildet worden sind. Die Fragmente wurden nicht näher untersucht.

Der Versuch machte jedenfalls deutlich, daß die Möglichkeit einer Mg⁺⁺-katalysierten, spezifischen Spaltung nicht auf tRNA^{Phe} beschränkt ist.

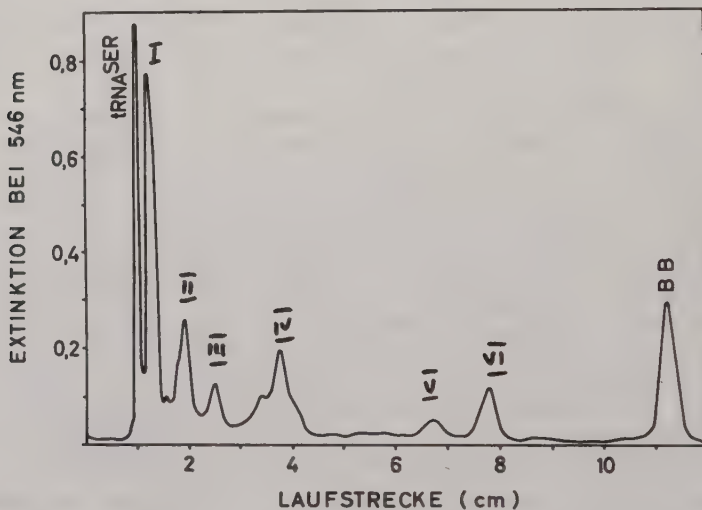


Abb. 20: Densitogramm von tRNA^{Ser}_{I/II} nach Alkalibehandlung in Gegenwart von Mg⁺⁺.

5 A₂₆₀-Einheiten/ml tRNA^{Ser}_{I/II} (nach 6.3. von zweiwertigen Ionen befreit) wurden in 0.05M Tris-HCl, pH 9.5, 4 mM MgCl₂ (Mg⁺⁺/P = 6) 4 Std. bei 50° inkubiert.

2.2.5. Diskussion.

Die Mg^{++} -katalysierte Spaltung verläuft wahrscheinlich, wie allgemein die Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen in RNA, über die intermediäre Bildung eines cyclischen Phosphorsäuretriesters. Dieser Übergangszustand stellt gewisse Anforderungen an die Beweglichkeit der Ribose-Phosphat-Kette, die in den Bereichen des tRNA-Moleküls, die durch Stapelung der Basen stabilisiert sind, wie etwa die doppelsträngigen Bereiche, wohl nicht erfüllt sind. So kann man annehmen, daß die Spaltung bevorzugt in einzelsträngigen Bereichen der tRNA stattfindet. Die Anticodon- und hU-Schleife sind in Gegenwart von Mg^{++} enzymatisch und chemisch leicht angreifbar (3,13), also in der nativen tRNA-Struktur exponiert; dagegen ist die T Ψ C-Schleife geschützt (79,80,81), und auch für Teile der S-Region wurde ein Schutz gegen chemischen Angriff nachgewiesen (58). Der Befund, daß tRNA^{Phe} bei hohen Mg^{++} -Konzentrationen vorwiegend zwischen den beiden Dihydrouridinen in der hU-Schleife gespalten wurde, ist damit verständlich. Die Spezifität wird wohl wesentlich dadurch bestimmt, daß die nicht-aromatischen Dihydrouracil-Basen keine stabilisierenden Wechselwirkungen mit Nachbarbasen eingehen können, so daß die Ribose-Phosphat-Kette in ihrer Umgebung am wenigsten starr ist. Ähnlich deuteten Eichhorn et al. (72) ihren Befund, daß Zn^{++} unter bestimmten Bedingungen Hefe-RNA bevorzugt zwischen Pyrimidinnucleosiden spaltet.

Wenn diese Interpretation zutrifft, muß das überraschend geringe Ausmaß der Spaltung in der Anticodon-Schleife als Hinweis auf eine starre Konformation dieser Schleife gewertet

werden. Auch andere experimentelle Befunde deuten darauf hin, daß eine bestimmte Konformation der Anticodon-Schleife durch Stapelung der Basen stabilisiert ist (82,83,84). Ein Modell für eine solche Struktur wurde vorgeschlagen (85).

Die Untersuchung der Mg^{++} -katalysierten Spaltung der $tRNA^{Phe}$ und $tRNA^{Phe}(HCl)$ unter verschiedenen Bedingungen hat gezeigt, daß die Spaltung nur dann spezifisch abläuft, wenn eine stabile Konformation der tRNA vorliegt. So fand in Gegenwart von Harnstoff nur unspezifische Spaltung statt.

Wurde die Spaltung bei niedrigeren Mg^{++} -Konzentrationen durchgeführt, als einem Mg^{++}/P -Verhältnis von etwa 0.5 entsprach, so wurde ein vollkommen anderes Spaltmuster als bei höheren Mg^{++} -Konzentrationen erhalten (vgl. Abb. 16). Daraus ließ sich schließen, daß beim Unterschreiten dieses Mg^{++}/P -Verhältnisses eine Änderung der Konformation der tRNA eintritt. Unter den Fragmenten, die nur bei der niedrigen Mg^{++} -Konzentration gebildet wurden, war eines, dessen Kettenlänge aus der elektrophoretischen Beweglichkeit zu etwa 66-70 Nucleotiden bestimmt wurde. Demnach muß der Bereich des Akzeptor- oder hU-Stammes von der Konformationsänderung betroffen sein. Ein Fragment ähnlicher Kettenlänge wurde bei der Partialspaltung reversibel denaturierter $tRNA^{Phe}$ mit T_1 -RNase erhalten und als Phe 11-76 identifiziert (86). Möglicherweise liegt $tRNA^{Phe}$ bei 50° und Mg^{++}/P -Verhältnissen kleiner als 0.5 in einer Konformation vor, die der Konformation der reversibel denaturierten $tRNA^{Phe}$ ähnlich ist. Diese Frage sollte sich durch die Analyse der unter diesen Bedingungen durch Mg^{++} -Spaltung gebildeten Fragmente klären lassen.

3. Ersatz der Base Y^+ in $tRNA^{Phe}$ durch kovalent gebundene, fluoreszierende Gruppen.

Die kovalente Verknüpfung der fluoreszierenden Farbstoffe Proflavin (2,6-Diaminocridin, im folgenden: PF) und Ethidiumbromid (2,7-Diamino-10-äthyl-9-phenyl-phenanthridiniumbromid, im folgenden: EB) mit der durch Abspaltung von Y^+ aus $tRNA^{Phe}$ (27) erhaltenen freien Aldehydgruppe der $tRNA^{Phe}(HCl)$ wird beschrieben (87). Die biologischen Aktivitäten der erhaltenen $tRNA^{Phe}$ -Farbstoff-Verbindungen werden im 5. Kapitel gemeinsam mit denen der Fragmentkombinationen beschrieben.

Zur Verknüpfung von Fluoreszenzfarbstoffen mit $tRNA$ wurde ein Verfahren angegeben (32,33), bei dem Acridinderivate mit Amin- und Hydrazinsubstituenten mit dem durch Perjodatoxidation des 3'-endständigen Nucleosids der $tRNA$ erhaltenen Dialdehyd zur Reaktion gebracht wurden. Die Herstellung einer Schiff'schen Base durch Reaktion der Aldehydgruppe der $tRNA^{Phe}(HCl)$ mit primären Aminen erschien zunächst wegen der in Kapitel 2 beschriebenen Spaltung als wenig aussichtsreich. Die Verknüpfung der $tRNA^{Phe}(HCl)$ mit einem Säurehydrazid, die Versuche wurden mit radioaktivem Isonicotinsäurehydrazid durchgeführt, gelang nicht. Versuche, in denen die Abspaltung von Phosphorsäure aus Ribosephosphaten untersucht worden war, hatten ergeben, daß Ribose-2-phosphat gegenüber primären Aminen stabil ist (50,54). Eine Möglichkeit, die Spaltung der $tRNA^{Phe}(HCl)$ bei der Umsetzung mit primären Aminen zu verhindern, schien demnach die Umwandlung der Ribose in Erythrose zu sein, da die in der Ribose zur Aldehydgruppe β -ständige Phosphorsäureesterbindung in der Tetrose α -ständig wäre.

Eine Abspaltung des C-Atoms(1) der Ribose unter Bildung von Erythrose sollte durch Reaktion mit Perjodat möglich sein (88). Obwohl sich in späteren Versuchen herausstellte, daß der Umweg über die Tetrose nicht notwendig war, sollen die Versuche hier kurz beschrieben werden.

3.1. Umwandlung der freien Ribose in $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ in Erythrose.

Nach der Behandlung mit Perjodat unter Bedingungen, wie sie zur Oxidation des 3'-endständigen Nucleosids von tRNA angewendet worden waren (41), wurde $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ mit Anilin nicht mehr in Halbmoleküle gespalten. Abb. 21 zeigt den zeitlichen Verlauf der Umwandlung der Ribose in die Erythrose, gemessen an der zunehmenden Menge nicht mehr spaltbarer tRNA auf der Disk-Elektrophorese.

Um nachzuweisen, daß in der so erhaltenen $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl}, \text{H}_2\text{O}_4)$ eine Tetrose mit freier Aldehydgruppe vorlag, wurde die oxidierte tRNA mit $^3\text{H-NaBH}_4$ reduziert und mit T_1 -RNase vollständig gespalten. Die Oligonucleotide wurden durch Disk-Elektrophorese getrennt. Aus dem Auftreten von radioaktivem Dodekannucleotid, das die Tetrose enthalten sollte, ging hervor, daß das erwartete Produkt vorlag. Da das 3'-endständige oxidierte Adenosin der $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl}, \text{H}_2\text{O}_4)$ durch Behandlung mit Anilin vollständig abgespalten werden konnte (Bedingungen des Whitfeld-Abbaus nach (41); vgl. auch 2.1.1.3.), war die Aldehydgruppe der Erythrose wieder die einzige Stelle in der $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl}, \text{H}_2\text{O}_4)$, die unter milden Bedingungen mit primären Aminen reagieren sollte.

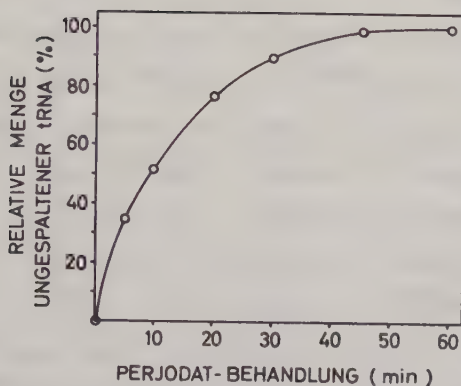


Abb. 21: Kinetik der Abspaltung der freien Aldehydgruppe von $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ mit Perjodat.

6 A_{260} -Einheiten/ml $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ wurden bei 0° (unter Lichtabschluß) in 0.1M Na-Acetat, 5 mM MgCl_2 , pH 5.2, mit 5 mM NaJO_4 inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde die Reaktion in Aliquots durch Zugabe von Glykol (ca. 1M) unterbrochen. Die alkoholgefällten Proben wurden mit Anilin behandelt (6.1.1.) und disk-elektrophoretisch getrennt. Das Verhältnis der intakten tRNA zur Gesamtmenge an tRNA und Halbmolekülen wurde den Densitogrammen entnommen.

3.2. Vergleich des Proflavin-Einbaus in $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ und $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl}, \text{HJO}_4)$.

Unter Bedingungen, wie sie für die Bindung von Acriflavin an das perjodatoxidierte 3'-Ende von tRNA angegeben worden sind (32), wurde PF mit $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$, $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl}, \text{HJO}_4)$ und $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ umgesetzt. Die Menge des eingebauten Farbstoffs wurde durch Messung der Extinktion bestimmt. Unter den hier angewendeten, noch nicht optimalen Bedingungen (vgl. 5.3.), wurde in $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ wesentlich mehr PF eingebaut als in $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl}, \text{HJO}_4)$. Der Einbau in tRNA^{Phe} war maximal 5 % der für die 1:1-Verbindung erwarteten Menge. Die Untersuchung der markierten tRNAs auf der Disk-Elektrophorese zeigte nun, daß die $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ bei der Reaktion vollkommen intakt geblieben war. Der Umweg über $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl}, \text{HJO}_4)$ war demnach nicht notwendig, so daß alle weiteren Versuche mit $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ ausgeführt wurden. Da der Farbstoff in $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HJO}_4)$ -PF sterisch anders angeordnet ist als in tRNA^{Phe} -PF, lassen sich aus dem Vergleich der Eigenschaften der beiden Verbindungen vielleicht Aussagen über Unterschiede in der Konformation der Anticodon-Schleife gewinnen. Die spektralen Daten der $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HJO}_4)$ -PF sind in Tabelle 5 mit aufgeführt.

3.3. Einbau von Proflavin und Ethidiumbromid in $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$.

Abb. 22 zeigt den zeitlichen Verlauf der Reaktion der $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ mit PF (125facher molarer Überschuß) und EB (400facher molarer Überschuß). Bei geringerem Farbstoffüberschuß blieb die Reaktion unvollständig. Bei allen untersuchten Farbstoff/tRNA-Verhältnissen fiel die tRNA als intensiv gefärbter Farbstoffkom-

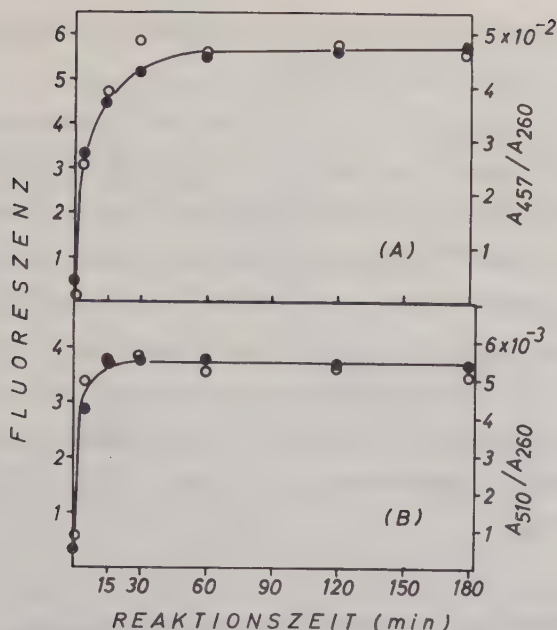


Abb. 22: Kinetik der Reaktion der $tRNA^{Phe}(HCl)$ mit A) Proflavin und B) Ethidiumbromid.

A) Je 1 A_{260} -Einheit $tRNA^{Phe}(HCl)$ wurde mit PF umgesetzt (6.3.1.). Die Fluoreszenz wurde bei 507 nm (Anregung bei 463 nm) gemessen.

B) Je 5 A_{260} -Einheiten $tRNA^{Phe}(HCl)$ wurden mit EB umgesetzt (6.3.2.). Die Fluoreszenz wurde bei 578 nm (Anregung bei 300 nm) gemessen.

(●-●) Farbstoffextinktion am sichtbaren λ_{max}/A_{260} ,
 (○-○) Fluoreszenzintensität/ A_{260} .

plex aus. Aus der Untersuchung der assoziativen Bindung der Farbstoffe an tRNA ist bekannt, daß sich bei der Bindung die Extinktionskoeffizienten von PF (37) und EB (35) ändern. Zur Bestimmung der Menge gebundenen Farbstoffs wurden daher die Extinktionskoeffizienten der assoziativ gebundenen Farbstoffe verwendet (Tabelle 5). Für die 1:1-Farbstoff-tRNA-Verbindungen

erhält man damit die folgenden Verhältnisse der Extinktionen von Farbstoff und tRNA: $\text{tRNA}^{\text{Phe}}\text{-PF } A_{457}/A_{260} = 5.3 \times 10^{-2}$; $\text{tRNA}^{\text{Phe}}\text{-EB } A_{510}/A_{260} = 6.3 \times 10^{-3}$. Aus den Plateauwerten in Abb. 22 geht hervor, daß von beiden Farbstoffen etwa 0.9 Mol/Mol tRNA eingebaut wurden. Unter den gleichen Bedingungen wurden je Mol tRNA^{Phe} höchstens 0.05 Mol Farbstoff gebunden.

Beide Farbstoffe haben eine starke Absorption bei 260 nm. Die bei 260 nm gemessene Extinktion wurde daher um die Farbstoffextinktion bei dieser Wellenlänge korrigiert, um ein sicheres Maß für die tRNA-Menge zu haben. Folgende Extinktionskoeffizienten wurden verwendet: PF $\epsilon_{260} = 4.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; EB $\epsilon_{260} = 1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.4. Stabilisierung der tRNA^{Phe} -Farbstoff-Verbindungen durch Reduktion mit NaBH_4 .

Bei der Kondensation von Aldosen mit primären aromatischen Aminen entstehen im allgemeinen N-Glykoside; ob als Zwischenprodukte auch Schiff'sche Basen gebildet werden, ist nicht sicher (89). N-Glykoside zeigen Mutarotation, wobei die Umwandlung der Anomeren wahrscheinlich über die offenkettigen Schiff'schen Basen erfolgt.

Die tRNA^{Phe} -Farbstoff-Verbindungen waren bei neutralem pH stabil und wurden bei pH 4 rasch hydrolysiert (Abb. 23). Nach Reduktion mit NaBH_4 waren sie auch bei pH 4 stabil. Die Stabilisierung ist wohl auf eine Reduktion der Schiff'schen Basen aus $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ und Farbstoff, die in geringer Menge im Gleichgewicht mit den N-Glykosiden stehen, zu den sekundären Aminen zurückzuführen. Die Reduktion war nach 12-15 min voll-

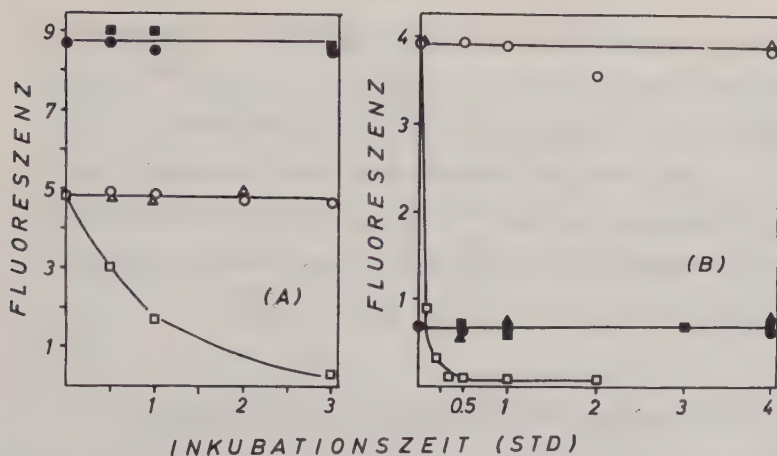


Abb. 23: Säurebehandlung von A) tRNA^{Phe}-PF und tRNA^{Phe}-PF-red, B) tRNA^{Phe}-EB und tRNA^{Phe}-EB-red.

Die markierten tRNAs wurden bei 37° inkubiert in 0.1M Tris-H₂SO₄, pH 7.5 (Δ ▲), pH 7.0 (○ ●) und in 0.1M Na-Acetat, pH 4 (□ ■). Offene Symbole: nichtreduziert, ausgefüllte Symbole: reduziert. Die Aliquots wurden bei pH 7.5 mit Phenol und Äther extrahiert (6.3.1.). Die Fluoreszenz der nicht reduzierten Proben wurde wie in Abb. 22 gemessen. Die Fluoreszenz der tRNA^{Phe}-PF-red wurde bei 500 nm (Anregung bei 465 nm), die der tRNA^{Phe}-EB-red bei 585 nm (Anregung bei 305 nm) gemessen. Aufgetragen ist Fluoreszenzintensität/ A₂₆₀.

ständig (pH 7.5, 0°; s. 6.3.3.), wie durch die zunehmende Stabilität gegen Säure gemessen wurde. Die chromatografische Analyse des T₁-RNase-Hydrolysats einer mit ³H-NaBH₄ reduzierten tRNA^{Phe}-PF zeigte, daß unter diesen Bedingungen nur etwa 5% des Dihydrouracils reduziert wurde.

Beide tRNA^{Phe}-Farbstoff-Verbindungen wurden während der Reduktion farblos. Bei der nachfolgenden Inkubation bei pH 4 (6.3.3.) trat die Farbe wieder auf. Wurde freies PF analog reduziert und reoxidiert, so zeigte es das gleiche Absorptions-

und Emissionsspektrum wie unbehandeltes PF. Die Veränderung des PF-Spektrums, die bei der Reduktion der tRNA^{Phe} -PF beobachtet wurden (s. Tabelle 5), ist also wahrscheinlich nicht auf eine Veränderung des Farbstoffmoleküls zurückzuführen. Bei der Reduktion der tRNA^{Phe} -EB wurden möglicherweise verschiedene Produkte gebildet. Diese Frage sowie die Reduktion von freiem EB wurden noch nicht näher untersucht.

3.5. Isolierung der tRNA^{Phe} -Farbstoff-Verbindungen.

tRNA^{Phe} -PF ließ sich durch Chromatografie an BD-Cellulose von unmarkierter tRNA^{Phe} (HCl) abtrennen (Abb. 24); tRNA^{Phe} -PF-red verhielt sich ähnlich. Die Schulter neben dem Hauptgipfel wurde regelmäßig beobachtet. Auch tRNA^{Phe} -EB und tRNA^{Phe} -EB-red konnten analog isoliert werden. Bei der Chromatografie dieser Verbindungen trat eine noch deutlicher ausgeprägte Schulter neben dem Hauptgipfel auf, in der das Verhältnis der Fluoreszenzintensität zur tRNA-Absorption wesentlich niedriger als im Hauptgipfel war. Diese Heterogenität deutet darauf hin, daß die tRNA-Farbstoff-Verbindungen unter den Bedingungen der Chromatografie in verschiedenen Konformationen vorliegen. Neben Unterschieden in der Gesamtkonformation der tRNA kommen dafür besonders verschiedene Stellungen der Farbstoffmoleküle in Frage. Falls die Farbstoffe in den unreduzierten Verbindungen N-glykosidisch gebunden sind, könnten α - und β -Anomere vorliegen. Bei den reduzierten Verbindungen sind Rotationsisomere denkbar, da die Drehung der Farbstoffmoleküle um die unsymmetrische Bindungsachse wegen der Wechselwirkung mit den Nachbarbasen (s. 3.7.) wahrscheinlich eingeschränkt ist. Kalotten-

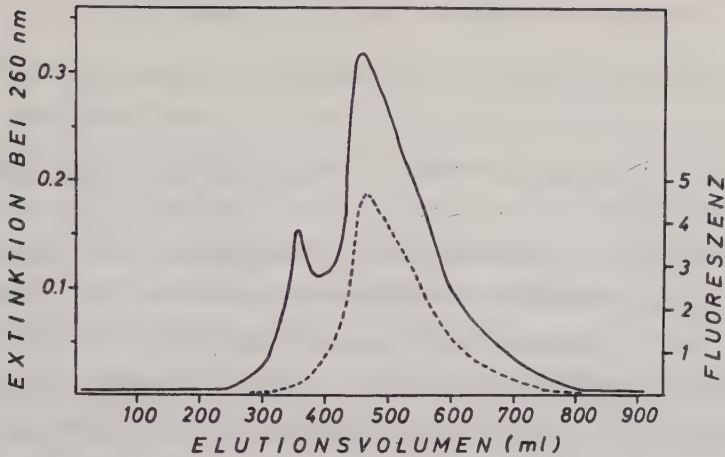


Abb. 24: Säulenchromatografie der $\text{tRNA}^{\text{Phe}}\text{-PF}$.
70 A_{260} -Einheiten $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ wurden mit PF umgesetzt (6.3.1.)
Nach der Extraktion wurde das Gemisch an einer BD-Cellulose-Säule (1.5x 30 cm) chromatografiert mit einem Gradienten von je 400 ml 0.4 und 0.8M NaCl in 0.01M Tris HCl, 5 mM MgCl_2 , pH 7.0.
(—) Extinktion; (-----) Fluoreszenzintensität bei 507 nm (Anregung bei 463 nm).

modelle zeigen, daß die Farbstoffmoleküle in den verschiedenen Stellungen verschieden weit aus der Nucleinsäurekette herausgedreht sind. Je nach der Stellung der Farbstoffe können damit die positiven Ladungen, die beide tragen, und beim EB auch der unsymmetrisch angeordnete Phenylrest das Verhalten der tRNA-Farbstoff-Verbindungen bei der Chromatografie unterschiedlich stark beeinflussen.

3.6. Oligonucleotidanalysen der tRNA^{Phe}-Farbstoff-Verbindungen.

Bei der Chromatografie eines T₁-RNase-Hydrolysats der tRNA^{Phe}-PF-red wurde Fluoreszenz nur im Dodekanucleotid beobachtet (Abb. 25). Damit ist gezeigt, daß nur die freie Aldehydgruppe der tRNA^{Phe}(HCl) mit PF reagiert hatte. Der Anteil von etwa 30 % unmarkiertem Dodekanucleotid stimmt überein mit dem aus dem A₄₆₆/A₂₆₀-Verhältnis bestimmten Gehalt von 0.7 Mol PF/Mol tRNA der hier analysierten Präparation der tRNA^{Phe}-PF-red. tRNA^{Phe}-PF, tRNA^{Phe}-EB und tRNA^{Phe}-EB-red lieferten analoge Elutionsprofile. Das Dodekanucleotid-EB-red aus tRNA^{Phe}-EB-red zeigte bei der Messung im Säuleneluat, das 7 M Harnstoff ent-

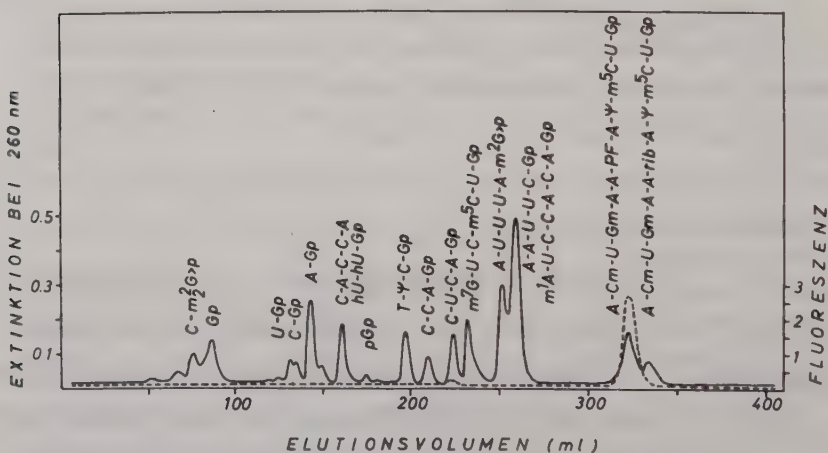


Abb. 25: Chromatografie eines T₁-RNase-Hydrolysats der tRNA^{Phe}-PF-red.

15 A₂₆₀-Einheiten tRNA^{Phe}-PF-red wurden mit 100 Einheiten T₁-RNase vollständig gespalten (6.6.2.) und an DEAE-Cellulose chromatografiert (6.7.1.).

(—) Extinktion; (-----) Fluoreszenzintensität bei 500 nm (Anregung bei 465 nm).

hielt, keine Fluoreszenz. Nach dem Entfernen des Harnstoffs durch Dialyse wurde wieder die normale Fluoreszenz beobachtet.

3.7. Spektrale Eigenschaften der tRNA^{Phe}-Farbstoff-Verbindungen.

Bei der kovalenten Bindung von PF und EB an die tRNA^{Phe}(HCl) trat eine Rotverschiebung der sichtbaren Absorptionsmaxima der Farbstoffe auf (Tabelle 5). Ähnliche Verschiebungen der Spektren treten auf, wenn PF (37) und EB (35) mit tRNA oder anderen Nucleinsäuren Komplexe bilden. In derartigen Komplexen sind die Farbstoffmoleküle wahrscheinlich zwischen koplanar aufeinandergestapelte Basen in geordneten helicalen oder doppelhelicalen Bereichen der Nucleinsäuren eingelagert ("intercaliert") (90). Die Verschiebungen der Absorptionsspektren werden auf die Wechselwirkung der aromatischen Farbstoffe mit den aromatischen Basen der Nucleinsäure zurückgeführt. Die spektralen Daten in Tabelle 5 deuten darauf hin, daß die kovalent gebundenen Farbstoffe starke Wechselwirkungen mit den beiden benachbarten Adeninbasen eingehen. Die starke Erhöhung der Quantenausbeute der Fluoreszenz des EB bei der Bindung an tRNA^{Phe}(HCl), die auch bei tRNA-EB-Komplexen beobachtet wurde, ist ebenfalls ein Hinweis auf solche Wechselwirkungen. Eine weitere Rotverschiebung der Absorptionsmaxima der beiden Farbstoffe trat bei der Reduktion der tRNA^{Phe}-Farbstoff-Verbindungen auf. Sie ist wahrscheinlich auf eine noch bessere Überlappung der aromatischen Systeme der Farbstoffe mit denen der benachbarten Basen zurückzuführen, die durch die erhöhte Beweglichkeit der Farbstoffmoleküle ermöglicht wird. Die deut-

	Absorption (sichtbares $\lambda_{\max}$, nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	Emission ($\lambda_{\max}$, nm)	Relative Fluoreszenz- intensität
PF	443 (443)	41×10^3	507 (507)	≈ 1.0
trNA ^{Phe} -PF	457 (453)	33×10^3	507 (507)	1.3.
trNA ^{Phe} -PF-red	473 (466)	33×10^3	500 (500)	2.3.
trNA ^{Phe(HJO₄)} -PF	463			
Dodeka-PF	457		507	5.1
Dodeka-PF-red	463		500 (500)	3.9
EB	480	5.6×10^3	586	< 0.1
trNA ^{Phe} -EB	510	3.9×10^3	578	6.8
trNA ^{Phe} -EB-red	530	3.9×10^3	585	≈ 1.0

Tabelle 5: Spektrale Eigenschaften der trNA^{Phe}-Farbstoff-Verbindungen. Die Spektren wurden in 0.01M Tris-H₂SO₄, pH 7.5, gemessen; die Werte in Klammern nach Zugabe von 10 mM Mg-Acetat. Die Extinktionskoeffizienten von PF und EB wurden aus (37) und (35) entnommen; für die kovalent gebundenen Farbstoffe wurde angenommen, daß sie gleiche Extinktionskoeffizienten wie die assoziativ gebundenen (37,35) haben. Die Fluoreszenzdaten sind nicht korrigiert. Die Emission von PF wurde am jeweiligen sichtbaren $\lambda_{\max}$ angeregt, die von EB um 300 nm.

lichen Verschiebungen der Absorptionsmaxima des gebundenen PF bei Zusatz von Mg^{++} (Tabelle 5) zeigen, daß auch die Struktur der tRNA die Wechselwirkung der Farbstoffe mit den Basen beeinflusst.

Ein durch Totalhydrolyse der $tRNA^{Phe}$ -PF-red mit Alkali erhaltenes Nucleotidgemisch zeigte ein PF-Spektrum, das mit einem Absorptionsmaximum bei 445 nm dem Spektrum des freien PF ($\lambda_{max} = 443$ nm) sehr ähnlich war. Da das durch Reduktion der $tRNA^{Phe}$ -PF gebildete sekundäre Amin (vgl. 3.4.) gegen Alkali stabil sein sollte, deutet die Ähnlichkeit der Spektren darauf hin, daß die bei der Bindung des PF an $tRNA^{Phe}(HCl)$ beobachtete Rotverschiebung des Spektrums nicht durch die Substitution an der Aminogruppe des Farbstoffs bewirkt wird, sondern tatsächlich auf die oben diskutierten Wechselwirkungen mit den Adeninbasen zurückzuführen ist.

3.8. Diskussion.

Der beschriebene Einbau von PF und EB in $tRNA^{Phe}(HCl)$ bietet die Möglichkeit, in nahezu quantitativer Reaktion eine stark fluoreszierende Gruppe kovalent an eine bekannte Position der tRNA zu binden. Einige Versuche, die hier nicht beschrieben sind, zeigten, daß sich nicht nur Y^+ , sondern auch Dihydrouracil und 7-Methylguanin durch PF ersetzen lassen. Die Reaktion sollte auch zur Einführung anderer Substituenten, die primäre Aminogruppen tragen, in tRNA geeignet sein.

Aus den Absorptionsspektren der $tRNA^{Phe}$ -Farbstoff-Verbindungen ging hervor, daß zwischen den gebundenen Farbstoffen und den

benachbarten Basen starke Wechselwirkungen stattfinden. Die Anticodon-Schleife der markierten tRNAs muß demnach eine geordnete Struktur aufweisen, in der die Basen so angeordnet sind, daß ihre aromatischen Systeme überlappen.

Eine ähnlich weitgehende Überlappung der aromatischen Systeme von Farbstoff und Nachbarbasen, wie sie bei den tRNA^{Phe}-Farbstoff-Verbindungen durch die kovalente Bindung festgelegt ist, haben Pritchard et al. (91) für die assoziativ gebundenen, in helicalen und doppelhelicalen Bereichen der Nucleinsäuren intercalierten Farbstoffe vorgeschlagen. Dagegen ordnete Lerman (92) in seinem Modell der Intercalierung das Farbstoffmolekül symmetrisch im Bereich der Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren in doppelsträngigen Nucleinsäurebereichen an. Die Ähnlichkeit der spektralen Eigenschaften der kovalent gebundenen Farbstoffe mit denen der assoziativ gebundenen stützt das Modell von Pritchard et al.

4. Helix-Knäuel-Übergänge in Halbmolekülen der tRNA^{Phe} aus Hefe und Weizen.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen wurden gemeinsam mit G. Maass, D. Riesner und R. Römer ausgeführt. Die Ergebnisse der kinetischen Messungen, die D. Riesner durchgeführt hat, werden hier dargestellt, da sie für die Interpretation der Daten wichtig sind. Die technischen Einzelheiten der Versuchsanordnung sind ausführlich beschrieben in (76, 93, 94).

Geht eine Nucleinsäure vom geordneten helicalen oder doppel-

helicalen Zustand in den ungeordneten Knäuelzustand über, so nimmt ihre Extinktion zu, da bei diesem Übergang die Wechselwirkungen zwischen benachbarten Basen aufgehoben werden. Verfolgt man die Extinktion in Abhängigkeit von der Temperatur, zeigt sich die Entstapelung ungepaarter Basen in einem langsamen Anstieg der Extinktion über einen breiten Temperaturbereich. Dagegen führt die Entstapelung der Basen in doppelsträngigen Bereichen der Nucleinsäure, dh. das Öffnen der Basenpaare, zu einem Anstieg der Extinktion in einem schmalen Temperaturbereich. In Analogie zu einem Phasenübergang bezeichnet man den Vorgang auch als Schmelzen der doppelhelicalen Struktur und die Temperatur, bei der die Umwandlung zur Hälfte abgelaufen ist, als Schmelzpunkt (T_m , transition midpoint). Mit Hilfe von Relaxationsmessungen können die kinetischen Parameter solcher Übergänge bestimmt werden. Das Öffnen und Schließen von Nucleinsäure-Doppelsträngen läßt sich kinetisch mit einem "Alles-oder-nichts"-Modell beschreiben, dh. diese Übergänge verlaufen kooperativ.

Bei der thermischen Denaturierung von tRNA kann man schon auf Grund des Kleeblattmodells, das vier bis fünf doppelsträngige Bereiche aufweist, ebensoviele kooperative Übergänge erwarten. Die Auflösung einer Raumstruktur kann in einem weiteren kooperativen Prozeß ablaufen. Die verschiedenen Übergänge können unabhängig voneinander oder gekoppelt stattfinden. Die Messung der einzelnen Prozesse ist möglich, wenn sie unabhängig voneinander bei verschiedenen Temperaturen stattfinden, wie es z.B. bei tRNA^{Ala} aus Hefe der Fall ist (95).

Auch Messungen an isolierten tRNA-Fragmenten sollten die Zuordnung kooperativer Prozesse zu den entsprechenden Bereichen

des tRNA-Moleküls ermöglichen. Durch die im folgenden beschriebenen Messungen an den isolierten Halbmolekülen der tRNA^{Phe}, die die hU-Region bzw. TYC-Region der tRNA enthalten, konnte der Schmelzbereich dieser doppelsträngigen tRNA-Bereiche getrennt ermittelt werden. Die Untersuchung der Kombinationen der Halbmoleküle gab Aufschluß über ihre Stabilität. Die Frage der Stabilität von Fragmentkombinationen ist wichtig im Zusammenhang mit der Untersuchung ihrer biologischen Aktivität.

4.1. Untersuchung der getrennten und rekombinierten Halbmoleküle der tRNA^{Phe} aus Hefe.

Die Änderung der Extinktion mit der Temperatur wurde mit einem Differenzverfahren gemessen. In zwei getrennt thermostatisierbaren Küvetten befand sich dieselbe Lösung der tRNA oder der tRNA-Fragmente. Gemessen wurde die Extinktionsdifferenz der beiden Küvetten, zwischen denen jeweils eine Temperaturdifferenz von 1-5°, je nach Größe der Extinktionsänderung, eingestellt wurde. Die Temperatur wurde mit Hilfe von Thermistoren in den Küvetten gemessen.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Messungen wurden in Abwesenheit von Mg⁺⁺ vorgenommen (6.2.), da die Anwesenheit von Mg⁺⁺ zu einer starken Erhöhung der T_m-Werte und Kopplung sonst getrennter Übergänge führt. Dadurch wird die genaue Analyse der Schmelzkurven und besonders die Durchführung der kinetischen Messungen sehr erschwert. Wegen der großen Bedeutung von Mg⁺⁺-Ionen für die Ausbildung der nativen Struktur der tRNA lassen die so erhaltenen Daten keinen direkten Schluß auf die Tertiärstruktur der tRNA^{Phe} zu.

Die differentiellen Schmelzkurven der tRNA^{Phe} und ihrer ge-

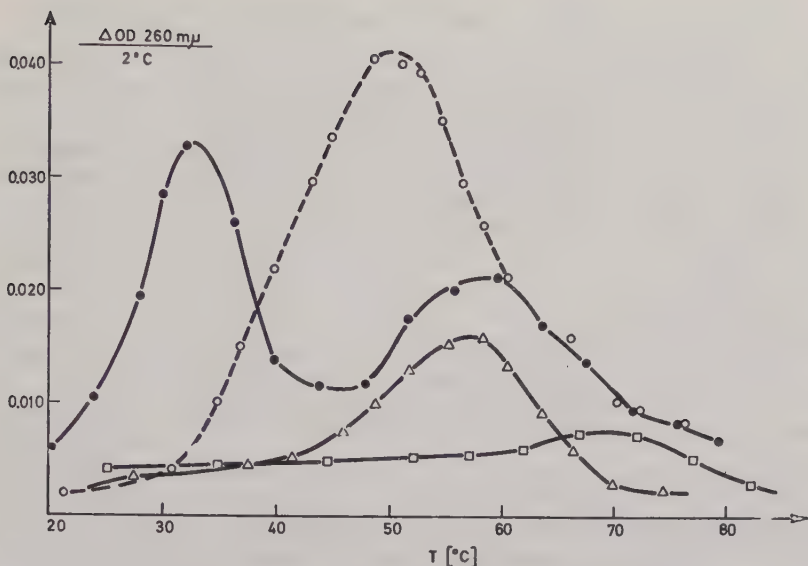
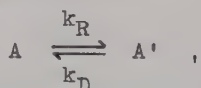


Abb. 26: Differentielle Schmelzkurven der Hefe tRNA^{Phe} sowie ihrer getrennten und kombinierten Halbmoleküle (96). (O---O) tRNA^{Phe} ($A_{260} = 2.08$ bei 20°), (Δ - Δ) Phe 38-76 ($A_{260} = 1.04$ bei 20°), ($\square$ - $\square$) Phe 1-36 ($A_{260} = 1.04$ bei 20°), ($\bullet$ - $\bullet$) äquimolare Mischung Phe 1-36 + Phe 38-76 ($A_{260} = 2.08$ bei 20°). Alle Messungen in 0.01M Na-Cacodylat, 0.1M NaCl, pH 6.8.

trennten und rekombinierten Halbmoleküle sind in Abb. 26 dargestellt. Das Verhalten der einzelnen Halbmoleküle soll zunächst betrachtet werden. Beide zeigen einen kooperativen Schmelzeffekt, Phe 1-36 zwischen 65° und 80° ($T_m = 70^\circ$) und Phe 38-76 zwischen 45° und 70° ($T_m = 58^\circ$). Dieser Effekt ist einem Prozeß überlagert, der über den ganzen Temperaturbereich stattfindet. Die kinetische Untersuchung der verschiedenen Bereiche der Schmelzkurve des Fragments Phe 38-76 durch Temperatursprünge über $2-5^\circ$ ergab für den Übergang zwischen 20° und

40° eine sehr schnelle Relaxationszeit, die im T-Sprung nicht mehr aufzulösen war (kleiner als 5 μ sec). Im Temperaturbereich des Schmelzgipfels wurde neben dieser sehr schnellen Zeit eine einzelne, temperaturabhängige Relaxationszeit zwischen 20 und 100 μ sec gefunden. Messungen mit zehnfach höherer Konzentration veränderten die kinetischen Daten nicht, so daß der beobachtete Prozeß als monomolekular anzusehen ist. Die Resultate mit Phe 1-36 waren ähnlich.

Die sehr schnelle Relaxationszeit ist der Entstapelung von Basen in einzelsträngigen Bereichen zuzuschreiben. Ein ähnlich breiter Übergang mit einer sehr schnellen Relaxationszeit wurde bei der Untersuchung des Hexanucleotids Gm-A-A-Y-A- Υ aus tRNA^{Phe} beobachtet. Durch Schallabsorptionsmessungen wurden für die Einzelstrangentstapelung Relaxationszeit von etwa 10⁻⁸ sec erhalten (97). Die Relaxationszeit von 20-100 μ sec ist auf die Entstapelung von Basen in doppelsträngigen Bereichen, hier also dem T Ψ C- bzw. hU-Stamm, zurückzuführen. Aus der Tatsache, daß nur ein langsamer Prozeß beobachtet wurde, ist abzuleiten, daß sich der Prozeß der Doppelhelixbildung bzw. -dissoziation durch ein einfaches Modell mit nur zwei Zuständen: vollständig dissoziiert und vollständig gepaart, beschreiben läßt:



wobei k_R und k_D die Geschwindigkeitskonstanten der Rekombination bzw. Dissoziation sind. Die reziproke Relaxationszeit ist

$$1/\tau = k_R + k_D = k_D (1 + K),$$

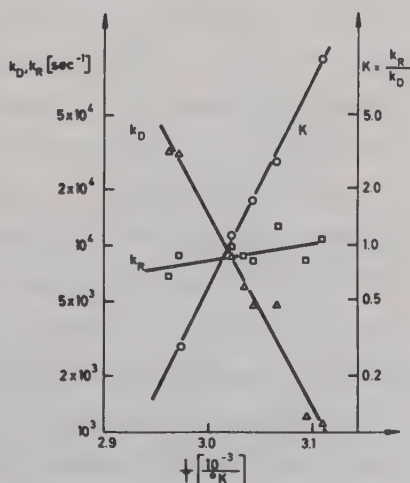
wenn die Gleichgewichtskonstante $K = k_R/k_D$ ist; demnach ist

$$k_D = \frac{1}{\tau (1 + K)} \quad \text{und} \quad k_R = \frac{K}{\tau (1 + K)}$$

Korrigiert man die Schmelzkurve um den Einzelstrangeffekt, dessen Anteil bei verschiedenen Temperaturen man den kinetischen Messungen entnehmen kann, so erhält man aus der korrigierten Kurve die Gleichgewichtskonstanten (K) des kooperativen Prozesses in Abhängigkeit von der Temperatur. Zusammen mit den gemessenen Relaxationszeiten ist damit auch die Temperaturabhängigkeit der Konstanten k_R und k_D gegeben. Die Ergebnisse für den kooperativen Effekt des Fragments Phe 38-76 zeigt Abb. 27.

Die aus den Steigungen der Geraden errechneten Reaktionsparameter, die Reaktionsenthalpie ΔH und die Aktivierungsenthalpie der Rekombination ΔE_R , sind in Tabelle 6 aufgeführt; ebenso die analog erhaltenen Daten für Phe 1-36. Auffallend ist der negative Wert der (scheinbaren) Aktivierungsenthalpie. Er zeigt, daß k_R nicht einen einzigen Elementarprozeß darstellt,

Abb. 27: Temperaturabhängigkeit der Konstanten K, k_R und k_D des kooperativen Effekts des Fragments Phe 38-76 (Abb.26) in der Auftragung nach van't Hoff bzw. Arrhenius (96).



sondern daß eine Folge von Reaktionen stattfindet; dabei ist k_R geschwindigkeitsbestimmend. Für die Doppelhelixbildung aus Oligo A und Oligo U fanden Eigen und Pörschke (98) einen Wert $\Delta E_R = -9$ kcal/Mol. Sie erklärten ihn damit, daß zunächst in einem schnellen Vorgleichgewicht ein oder zwei Basenpaare gebildet werden, an die sich im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ein weiteres Basenpaar anlagert. Nach diesem Keimbildungsschritt bilden sich die übrigen Basenpaare der Doppelhelix schnell aus. Die hier gefundene Aktivierungsenthalpie $\Delta E_R = -5$ kcal/Mol für die Ausbildung des T Ψ C-Doppelstranges und $\Delta E_R = -15$ kcal/Mol für die Bildung des hU-Stammes lassen sich ebenso erklären. Die Hypothese ist demnach auch auf kurze, gemischte Doppelhelices, deren Teile durch Schleifen verbunden sind, anwendbar. Auch hier ist die Bildung von zwei bis drei Basenpaaren geschwindigkeitsbestimmend.

Vergleicht man die gemessenen Reaktionsenthalpien mit den auf der Grundlage des Kleeblattmodells berechneten, so zeigt sich eine Übereinstimmung innerhalb der Fehlergrenzen (Tabelle 6). Allerdings weichen die Mittelwerte der Messungen systematisch um etwa 20 % nach oben ab. Das gilt auch für die Reaktionsenthalpie der Rekombination der beiden Halbmoleküle, die unten diskutiert wird. Eine ähnliche Abweichung war schon bei tRNA^{Ala} beobachtet worden (95). Zur Erklärung dieses Effekts kann man annehmen, daß die Basen in den Schleifen teilweise auch gestapelt sind, besonders die auf den Doppelstrang unmittelbar folgenden, und daß ihre Entstapelung zusammen mit der Öffnung des Doppelstrangs kooperativ erfolgt.

Die Schmelzkurve der äquimolaren Mischung der beiden Halbmoleküle (Abb. 26) ist oberhalb von etwa 40° eine Überlagerung der

	T_m (°C)	ΔH (kcal/Mol)	ΔH_{KL} (kcal/Mol)	$\Delta H \left(\begin{smallmatrix} GC \\ GC \end{smallmatrix} \right)$	$\Delta H \left(\begin{smallmatrix} GC \\ AU \end{smallmatrix} \right)$ (kcal/Mol)	$\Delta H \left(\begin{smallmatrix} AU \\ AU \end{smallmatrix} \right)$	ΔE_R (kcal/Mol)
Phe 38-76	58 ± 2	$- 55 \pm 5$	-40 ± 10	-11	-10	-8	$- 5 \pm 5$
Phe 1-36	70 ± 2	$- 40 \pm 10$	-35 ± 10	-13	-11	-9	-15 ± 10
Phe 1-36+	32.5	$- 95 \pm 10$	-70 ± 20	- 7	-7	-6	-13 ± 5
Phe 38-76	± 0.5						

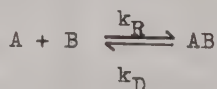
Tabelle 6: Reaktionsparameter der kooperativen Helix-Knäuel-Übergänge der getrennten und kombinierten Halbmoleküle der tRNA^{Phe} aus Hefe (96).

Die Reaktionsenthalpien der entsprechenden doppelhelicalen Bereiche des Kleeblattmodells (H_{KL}) wurden als Summe der Wechselwirkungen benachbarter Basenpaare berechnet. Die dabei zugrunde gelegten Enthalpien der Wechselwirkungen von GC-mit GC, GC-mit AU- und AU-mit AU-Basenpaaren wurden aus Literaturdaten abgeschätzt (95,99,100).

Kurven der getrennten Hälften. Zwischen 20° und 40° tritt ein zusätzlicher Gipfel auf ($T_m = 32.5^{\circ}$). Die gesamte Hyperchromizität der Hälftenkombination (gesamte Fläche unter der Kurve) ist ebenso groß wie die der $tRNA^{Phe}$. Wenn der zusätzliche Gipfel der Schmelzkurve auf die Rekombination und Dissoziation der beiden Halbmoleküle zurückzuführen ist, sollte der T_m -Wert dieser bimolekularen Reaktion konzentrationsabhängig sein. Die Verringerung der Konzentration der Halbmoleküle auf ein Viertel ergab eine Erniedrigung des T_m -Werts um $3 \pm 0.5^{\circ}$.

Der Rekombinationsprozeß der Halbmoleküle wurde kinetisch mit Hilfe von Temperatursprüngen über $2-4^{\circ}$ zwischen 24° und 32° näher untersucht. Im Maximum des Schmelzgipfels (32°) ließ sich der Relaxationseffekt praktisch vollständig durch einen einzigen, kooperativen Effekt mit einer Relaxationszeit im Sekundenbereich beschreiben; dabei ist abgesehen von der Einzelstrangentstapelung, die etwa 10 % der Gesamtamplitude ausmachte.

Für einen bimolekularen Prozeß



,sollte die reziproke Relaxationszeit

$$1/\tau = k_R (c_A + c_B) + k_D$$

sein. Da nun $c_A = c_B$ bzw. $c_A^2 = k_D/k_R c_{AB}$ ist, folgt

$$1/\tau^2 = 4k_R k_D (c_{AB} + c_A) + k_D^2 ;$$

daraus ergibt sich mit $c_{AB} + c_A = c_0$ unter Eliminierung der Gleichgewichtskonzentrationen

$$1/\tau^2 = 4 k_R k_D c_0 + k_D^2 .$$

$1/\tau_2$ sollte also linear von der Konzentration abhängen. Abb. 28 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit von $1/\tau_2$ bei zwei verschiedenen Temperaturen. Es ist das typische Bild einer bimolekularen Reaktion. Die Gleichgewichtskonstanten der Rekombination bei verschiedenen Temperaturen wurden aus der korrigierten Schmelzkurve entnommen, wie oben beschrieben. Durch Kombination des oben formulierten Zusammenhangs zwischen $1/\tau_2$ und k_R , k_D mit den Gleichgewichtsdaten der Schmelzkurve über das Massenwirkungsgesetz

$$\frac{c_{AB}}{c_A c_B} = \frac{c_0 - c_A}{c_A^2} = \frac{k_R}{k_D} = K$$

wurden für die Geschwindigkeitskonstanten der Rekombination bzw. Dissoziation folgende Werte erhalten:

Abb. 28: Konzentrationsabhängigkeit von $1/\tau_2$ bei der Rekombination von Phe 1-36 mit Phe 38-76 (96). Messung in 0.01 M Na-Cacodylat, 0.1 M NaCl, pH 6.8. Der Berechnung der Einwaagekonzentration eines Halbmoleküls, c_0 , wurde $\epsilon_{260} = 3.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ zugrunde gelegt.

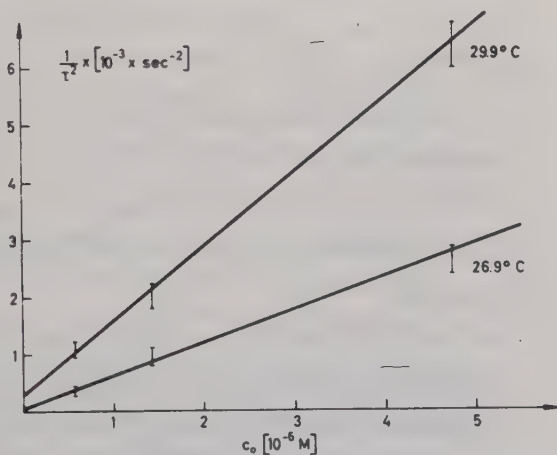
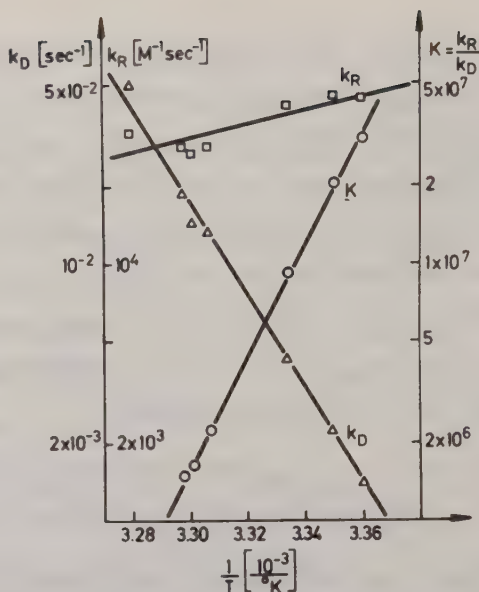


Abb. 29: Temperaturabhängigkeit der Konstanten K , k_R und k_D des Rekombinationsprozesses von Phe 1-36 + Phe 38-76 in der Auftragung nach van't Hoff bzw. Arrhenius (96).



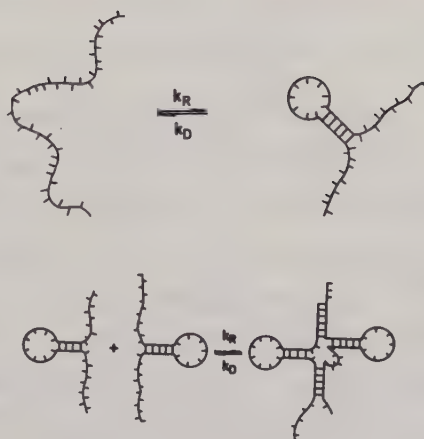
bei 26.9° war $k_R = 4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{sec}^{-1}$, und $k_D = 3 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$; bei 29.9° war $k_R = 2.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{sec}^{-1}$, und $k_D = 1.2 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ (alle $\pm 10 \%$).

Die Temperaturabhängigkeit von k_R und k_D über einen größeren Temperaturbereich und die Temperaturabhängigkeit von K zeigt Abb. 29. Die aus den Steigungen berechneten Reaktionsparameter für die Rekombination der beiden Halbmoleküle sind in Tabelle 6 angegeben.

Auch hier ist wieder die negative Aktivierungsenthalpie der Rekombination auffallend. Die Reaktionsenthalpie stimmt (mit der oben diskutierten Abweichung der Mittelwerte um 20 %) innerhalb der Fehlergrenzen mit der aus dem Kleeblattmodell abgeschätzten überein.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß in den getrennten Halbmolekülen der tRNA^{Phe} kooperative Helix-Knäuel-Übergänge stattfinden. Beim Mischen der beiden Halbmoleküle findet die

Abb. 30: Schematische Darstellung der kooperativen Helix-Knäuel-Übergänge in Halbmolekülen der tRNA^{Phe} aus Hefe (96).



Rekombination in einem einzigen, kooperativen Prozeß statt.

Die Ausbildung der Doppelstränge des Akzeptor- und Anticodon-Stammes ist hier demnach gekoppelt (Abb. 30).

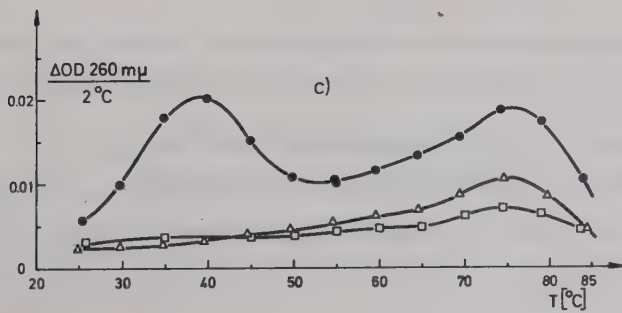
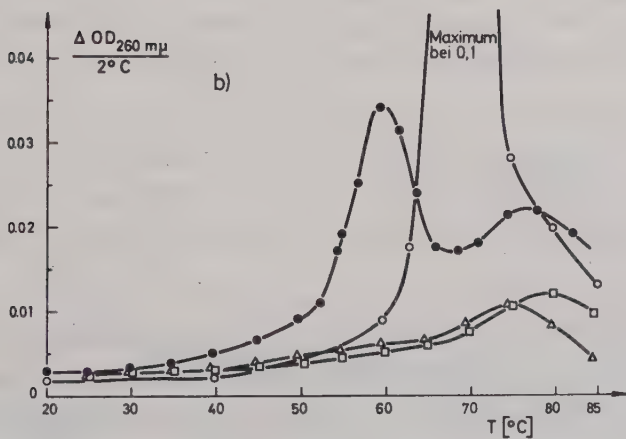
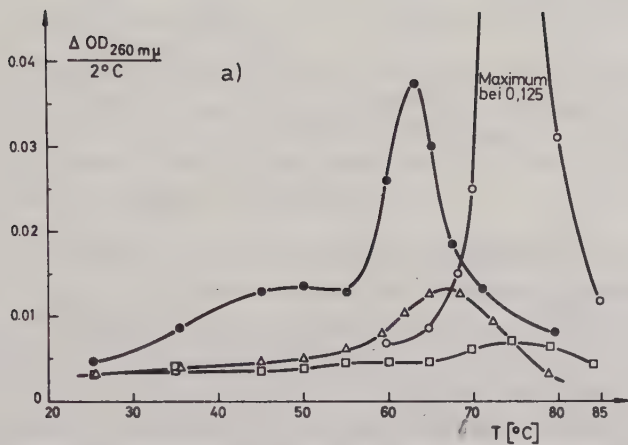
Die gemessenen Reaktionsenthalpien stimmen mit den für die Basenpaare des Kleeblattmodells berechneten innerhalb der Fehlergrenzen überein. In den isolierten und rekombinierten Fragmenten liegen demnach die nach dem Kleeblattmodell erwarteten Basenpaare vor. Aus dem Befund, daß die Gesamthyperchromizität der Hälftenkombination und der tRNA^{Phe} gleich ist, geht hervor, daß die Struktur der tRNA^{Phe} in Mg^{++} -freier Lösung hauptsächlich durch die Basenpaare des Kleeblattmodells bestimmt wird. Daneben gibt es Hinweise auf eine Beteiligung der Basen in den Schleifen an der Stapelung. Die Ausbildung weiterer, gestapelter Basenpaare scheint nicht stattzufinden.

4.2. Untersuchung der Halbmoleküle der tRNA^{Phe} aus Hefe und Weizen und ihrer homologen und heterologen Kombinationen.

Die homologen und heterologen Kombinationen der Halbmoleküle Phe 1-36 und Phe 38-76 aus Hefe und Weizen waren mit Phe-tRNA-Synthetase aus Hefe beladbar; die Akzeptoraktivität war, je nach Kombination, 25-70 % der Akzeptoraktivität der intakten tRNA^{Phe} (45). In den heterologen Kombinationen können sich im Akzeptor- und Anticodon-Stamm zwei (Weizen Phe 1-36 + Hefe Phe 38-76) bzw. vier (Hefe Phe 1-36 + Weizen Phe 38-76) Basenpaare weniger ausbilden als in den homologen, wenn man die Kleeblattmodelle zugrunde legt (vgl. Abb. 3 in (45)).

Eine Analyse der Schmelzkurven der verschiedenen Kombinationen sollte Aufschluß über zwei Fragen geben können: 1) Ist die unterschiedliche Beladbarkeit auf unvollständige Rekombination zurückzuführen, und 2) entspricht die Zahl der gebildeten Basenpaare der nach dem Kleeblattmodell erwarteten?

Die differentiellen Schmelzkurven der einzelnen Halbmoleküle und ihrer verschiedenen Kombinationen, gemessen in Gegenwart von 5 mM MgCl₂, zeigt Abb. 31. Ein Vergleich der Abb. 31 a mit Abb. 26 zeigt den Einfluß der Mg⁺⁺-Ionen auf das Schmelzverhalten der Hefe tRNA^{Phe} und der Halbmoleküle sowie ihrer Kombination. Besonders der T_m-Wert der Rekombination ist sehr stark zu höheren Temperaturen verschoben und fällt mit den Übergängen in den getrennten Halbmolekülen zusammen. Bei der Temperatur des Akzeptoraktivitätstests (25°) findet keinerlei kooperatives Schmelzen statt, die beiden Hälften sind vollständig rekombiniert. Das gleiche gilt für die homologe Kombination der Halbmoleküle aus Weizen tRNA^{Phe} (Abb. 31 b). Die



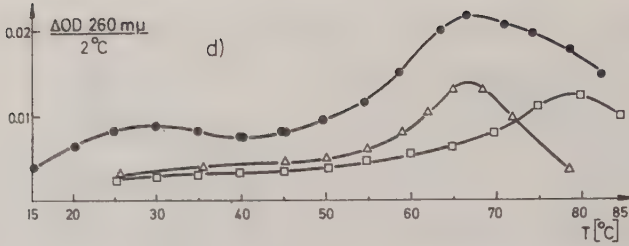


Abb. 31: Differentielle Schmelzkurven von tRNA^{Phe} aus Hefe und Weizen und ihren Halbmolekülen (101).

a) Hefe tRNA^{Phe} und Halbmoleküle, b) Weizen tRNA^{Phe} und Halbmoleküle, c) Hefe Phe 1-36 und Weizen Phe 38-76, d) Weizen Phe 1-36 und Hefe Phe 38-76.

(O-O) intakte tRNA^{Phe} ($A_{260} = 2.08$ bei 20°), ($\Delta-\Delta$) Phe 38-76 ($A_{260} = 1.04$ bei 20°), ($\square-\square$) Phe 1-36 ($A_{260} = 1.04$ bei 20°), ($\bullet-\bullet$) äquimolare Mischung Phe 1-36 + Phe 38-76 ($A_{260} = 2.08$ bei 20°). Alle Messungen in 0.01M Na-Cacodylat, 0.1M NaCl, 0.005M MgCl₂, pH 6.8.

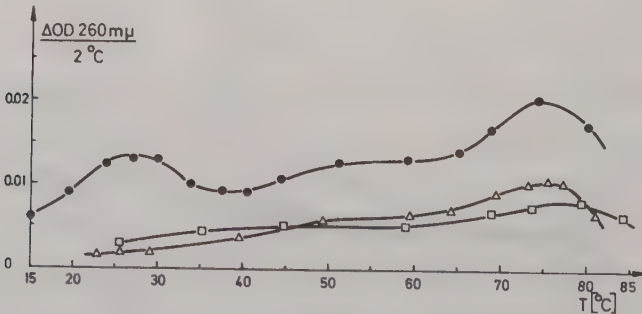


Abb. 32: Differentielle Schmelzkurven der Halbmoleküle Hefe Phe 1-36 und Weizen Phe 38-76 und ihrer äquimolaren Mischung (101).

Messungen in 0.01M Na-Cacodylat, 0.5M NaCl, pH 6.8.

Symbole und Konzentrationen wie in Abb. 31.

Kombination Hefe Phe 1-36 + Weizen Phe 38-76 zeigte einen deutlichen Rekombinationsgipfel mit T_m bei 40° (Abb. 31 c). Der wenig ausgeprägte, breite Gipfel (T_m bei 30°) der Kombination Weizen Phe 1-36 + Hefe Phe 38-76 (Abb. 31 d) war mit einer Relaxationszeit im Sekundenbereich ebenfalls eindeutig als Rekombinationseffekt charakterisiert.

Vergleicht man die Bedingungen des Akzeptoraktivitätstests (15 mM Mg^{++} , 10 mM ATP, 25° (45)) mit den Bedingungen der hier beschriebenen Messungen, kann man eine praktisch vollständige Rekombination der Fragmente im Test annehmen, abgesehen vielleicht von der Kombination Weizen Phe 1-36 + Hefe Phe 38-76. Im übrigen verläuft der Prozeß der Rekombination mit Relaxationszeiten im Sekundenbereich so schnell, daß auch bei unvollständiger Rekombination im Gleichgewicht immer rekombinierte Moleküle vorhanden sein sollten, die beladbar sind. Bei einer Inkubationszeit von 45 min sollten damit alle aktiven Kombinationen beladen werden. Unvollständige Rekombination scheidet somit als Ursache für die niedrige Beladbarkeit aus.

Zur Beantwortung der Frage nach der Zahl der in den heterologen Hälftenkombinationen gebildeten Basenpaare ist eine genauere kinetische Analyse nötig. Aus den in 4.1. diskutierten Gründen sollte diese in Abwesenheit von Mg^{++} -Ionen vorgenommen werden. Bei der Kombination Hefe Phe 1-36 + Weizen Phe 38-76 konnte der Rekombinationsgipfel dann erst bei Zusatz von 0.5 M NaCl oberhalb von 15° ($T_m = 28^\circ$) beobachtet werden (Abb. 32). Eine Verdopplung der NaCl-Konzentration erhöhte den T_m -Wert um 9° . Durch Zusatz von Mg^{++} oder Erhöhung der Ionenstärke

werden die T_m -Werte doppelsträngiger Nucleinsäuren allgemein zu höheren Temperaturen verschoben; diese Effekte sind ausführlich diskutiert in (76,93). Bei dieser Kombination, wie auch bei der homologen der Halbmoleküle aus Hefe $tRNA^{Phe}$ (Abb. 26), ist demnach zur Rekombination die Anwesenheit von Mg^{++} nicht notwendig. Die andere heterologe Kombination zeigte selbst in 1 M NaCl bei Abwesenheit von Mg^{++} -Ionen keinen Rekombinationsgipfel oberhalb von 10^0 . Deshalb wurde nur die heterologe Kombination Hefe Phe 1-36 + Weizen Phe 38-76 kinetisch untersucht.

Die im Rekombinationsgipfel (Abb. 32) gefundenen Relaxationszeiten waren qualitativ ähnlich den für die Kombination der Halbmoleküle der Hefe $tRNA^{Phe}$ gefundenen (4.1.). Eine analoge Auswertung ergab für die Reaktionsparameter der Rekombination folgende Werte (kcal/Mol): $\Delta H = -60 \pm 5$; $\Delta E_R = 8 \pm 5$; $\Delta E_D = 68 \pm 5$. Im Gegensatz zu den in 4.1. gefundenen Werten erscheint hier ein positiver Wert für ΔE_R . Eine Erklärung lieferte die Betrachtung des Schmelzverhaltens des isolierten Fragments Weizen Phe 38-76. Es zeigte vor dem Hauptgipfel eine breite Schulter zwischen 40^0 und 60^0 (Abb. 32), die auch bei den Schmelzkurven mit Mg^{++} zu sehen ist (Abb. 31 b,c). Temperatursprünge in diesem Bereich zeigten drei verschiedene Relaxationszeiten: Eine schneller als $5 \mu sec$, eine zweite zwischen 30 und $50 \mu sec$ und eine dritte zwischen 0.5 und 500 msec, je nach Temperatur. Die zweite ist ähnlich der im Hauptgipfel bei 75^0 gefundenen und deutet auf ein kooperatives Schmelzen von Basenpaaren zusätzlich zu den im Hauptgipfel schmelzenden hin. Solche Basenpaare sind möglich zwischen komplementären Basen in den freien Enden dieses Fragments. Die dritte, sehr langsame Relaxationszeit

läßt sich durch eine Umlagerung konkurrierender Doppelhelix-Strukturen des TYC-Stammes erklären, die über den bei dieser Temperatur nur schwach besetzten Knäuelzustand verlaufen muß. Die Bildung von Dimeren ist ausgeschlossen, da die Relaxationszeit unabhängig von der Konzentration war. Die Schulter der Schmelzkurve des Halbmoleküls Weizen Phe 38-76 taucht wieder auf in der Kurve der Kombination Hefe Phe 1-36 + Weizen Phe 38-76 (Abb. 32). Sie liegt bei wesentlich höherer Temperatur als der Rekombinationsgipfel, dh. die Rekombination findet bei Temperaturen statt, bei denen die zusätzlichen Basenpaare im Halbmolekül Weizen Phe 38-76 noch vorhanden sind. Man muß also für das Öffnen dieser Basenpaare ein Vergleichsgewicht vor der Rekombination annehmen. Die erforderliche positive Reaktionsenthalpie überkompensiert nun die negative Aktivierungsenthalpie der eigentlichen Rekombination, so daß insgesamt eine positive Aktivierungsenthalpie resultiert. Um die Differenz der Aktivierungsenthalpien der homologen und heterologen Rekombination zu erklären, müssen in Weizen Phe 38-76 drei zusätzliche Basenpaare vorhanden sein; diese sind nach der Sequenz des Fragments gerade möglich. Die bei der Rekombination von Hefe Phe 1-36 mit Weizen Phe 38-76 stattfindenden Prozesse sind in Abb. 33 dargestellt.

Wegen des Vergleichsgewichtes ist es nicht möglich, wie im Fall der homologen Kombination aus der Reaktionsenthalpie der Rekombination auf die Zahl der gebildeten Basenpaare zu schließen. Da aber der Dissoziationsprozeß davon nicht beeinflusst ist, sollte eine Abschätzung aus der Aktivierungsenthalpie der Dissoziation möglich sein. Vergleicht man die hier gefundene von 68 ± 5 kcal/Mol mit der für die homologe Kombination erhal-

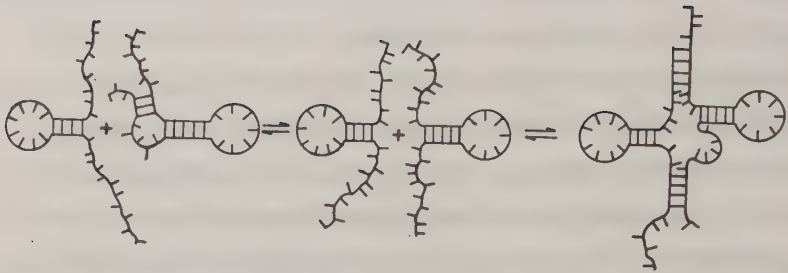


Abb. 33: Schematische Darstellung der kooperativen Prozesse bei der Rekombination von Hefe Phe 1-36 mit Weizen Phe 38-76 (101).

tenen (aus Tabelle 6: $\Delta E_D = \Delta E_R - \Delta H = 82 \text{ kcal/Mol}$) so bedeutet der Unterschied von etwa 15 kcal/Mol unter der Annahme gleicher $N_{\text{Nucleationslängen}}$ für beide Prozesse, daß 2 ± 2 Basenpaare weniger gebildet werden. Nach den Kleeblattmodellen sollten bei dieser heterologen Kombination vier Basenpaare weniger gebildet werden.

Wie bei der Kombination der Halbmoleküle der tRNA^{Phe} aus Hefe (4.1.) ließen sich bei den heterologen Kombinationen alle Bereiche der Schmelzkurven bestimmten Bereichen der Kleeblattmodelle zuordnen. Die nach dem Prinzip maximaler Basenpaarung für Weizen Phe 38-76 zu erwartenden zusätzlichen drei Basenpaare wurden beobachtet. Auch die gemessenen Reaktionsparameter ließen sich auf Grund des Kleeblattmodells verstehen.

5. Untersuchung der tRNA^{Phe}-Fragmente und der tRNA^{Phe}-Farbstoff-Verbindungen in biochemischen Testsystemen.

Aus dem Verhalten verschiedener Kombinationen der tRNA^{Phe}-Fragmente bei der Aminoacylierung sollten sich Folgerungen bezüglich der Synthetaseerkennungsregion der tRNA^{Phe} ziehen lassen. Ist eine Fragmentkombination, der zur ganzen tRNA einige Nucleotide fehlen, aminoacylierbar, so kann man für die fehlenden Nucleotide eine wesentliche Funktion bei der Bindung der Synthetase ausschließen. Umgekehrt bedeutet der Verlust der Akzeptoraktivität nicht ohne weiteres, daß die fehlenden Nucleotide zur Synthetaseerkennungsregion gehören, da das Entfernen von Teilen der tRNA-Sequenz dazu führen kann, daß sich die Konformation des für die Aminoacylierung wichtigen tRNA-Bereichs ändert. Ein solches Ausschlußverfahren erlaubt daher nur die Eingrenzung der Bereiche des tRNA-Moleküls, die für die Erkennung der Synthetase in Frage kommen.

Die Untersuchung der biologischen Aktivitäten der tRNA^{Phe}-Farbstoff-Verbindungen war aus zwei Gründen interessant. Die Verwendung der markierten tRNA^{Phe} zur Untersuchung ihrer Struktur und ihrer Wechselwirkung mit der Synthetase mit Hilfe der Fluoreszenzmessung setzt voraus, daß sie biologisch aktiv ist. Da die Substitution der Base Y⁺ durch PF und EB den Anticodon-Bereich betrifft, sollte neben der Aminoacylierung besonders der Ribosomenbindungstest ein Kriterium dafür sein, ob sich die markierte tRNA^{Phe} wie die native verhält, dh. eine ähnliche Struktur wie diese aufweist. Wie Thiebe und Zachau gezeigt haben, führt die Abspaltung der Base Y⁺ aus tRNA^{Phe} zum Verlust

der Aktivität im Ribosomenbindungstest (27) und der Beladbarkeit durch Synthetase aus *E. coli* (102). Mit Hilfe physikalischer Messungen wurde nachgewiesen, daß die Abspaltung von Y^+ eine Konformationsänderung der tRNA verursacht (102). Der Einbau von PF anstelle von Y^+ bot nun die Möglichkeit, die Frage zu klären, ob diese Aktivitäten der tRNA^{Phe} spezifisch von der Anwesenheit der Base Y^+ abhängen, oder ob die Konformationsänderung der tRNA für den Verlust dieser Aktivitäten verantwortlich ist.

5.1. Untersuchung der tRNA^{Phe}-Fragmente.

5.1.1. Aminoacylierung.

Alle untersuchten Fragmente waren auf der Disk-Elektrophorese einheitlich. Damit waren Verunreinigungen durch mehr als 1 % intakte tRNA^{Phe} und Fragmente mit anderen elektrophoretischen Beweglichkeiten ausgeschlossen. Auch der Befund, daß keines der Fragmente allein aminoacylierbar war, schloß die Anwesenheit von mehr als 1 % tRNA^{Phe} oder komplementären Fragmenten in den einzelnen Präparaten aus.

Die Akzeptoraktivitäten der verschiedenen untersuchten Fragmentkombinationen sind in Abb. 34 angegeben. Bei den Kombinationen Phe 1-36 + Phe 38-76 und Phe 1-36 + Phe 47-76 bewirkte eine längere Inkubation keine Steigerung des Einbaus. Auch die Senkung der Inkubationstemperatur auf 10° hatte keinen Effekt. Die bei der Kombination D) angegebene Beladung wurde erst mit einem etwa zweifachen molaren Überschuß des Fragments Phe 1-36 erreicht (Abb. 35). Auch bei der umgekehrten Titration von

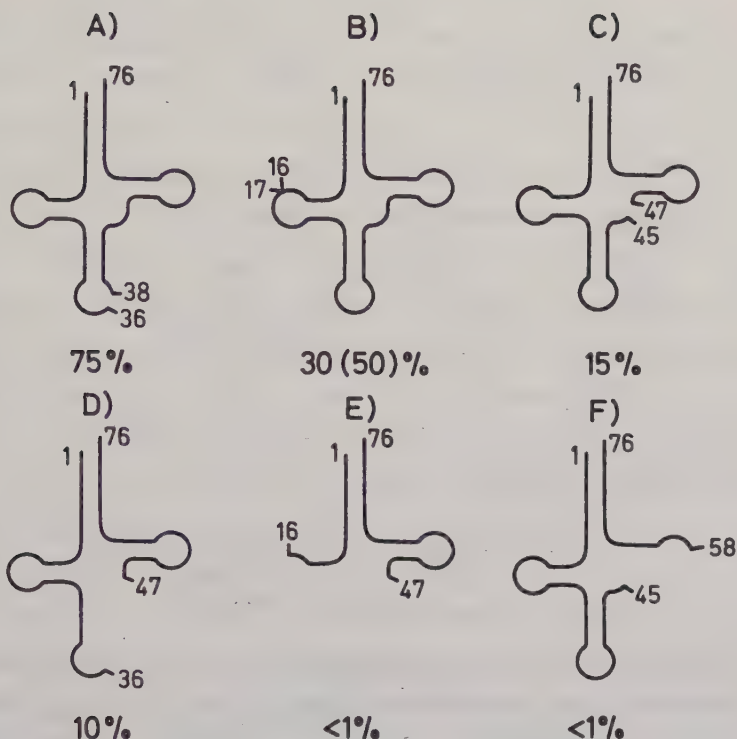


Abb. 34: Akzeptoraktivität von Kombinationen der tRNA^{Phe}-Fragmente.

0.03 - 0.06 A₂₆₀-Einheiten des jeweiligen CCA-Fragments wurden mit einem 2-3fachen molaren Überschuß des pG-Fragments präinkubiert und mit angereicherter Phe-tRNA-Synthetase aminoacyliert (6.8.).

Der Einbau in pMol Phe/A₂₆₀-Einheit des CCA-Fragments wurde unter Berücksichtigung der Kettenlänge auf die Akzeptoraktivität der tRNA^{Phe} bezogen (100 % entsprechen 1250 pMol Phe/A₂₆₀-Einheit der tRNA^{Phe}). Der bei B) in K₁ammern gesetzte Wert wurde durch Aminoacylierung des Spaltungsgemischs erhalten; der Einbau in etwa 10 % ungespaltene tRNA^{Phe} ist abgezogen.

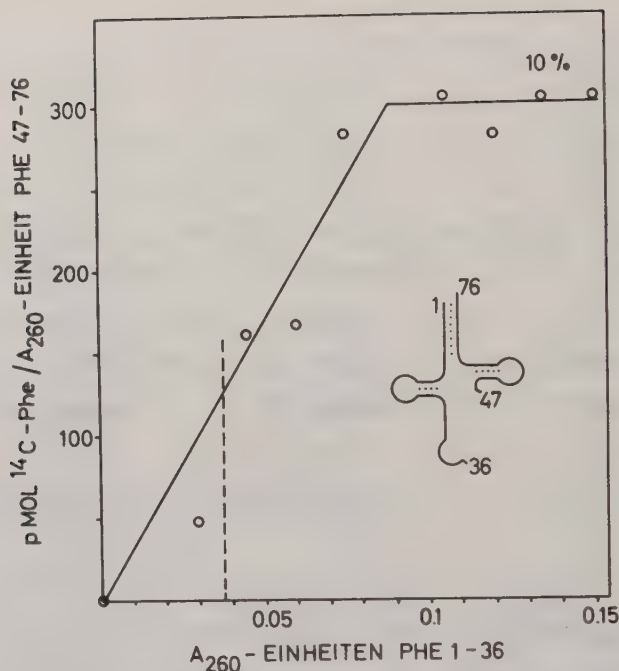


Abb. 35: Akzeptoraktivität der Kombination Phe 1-36 + Phe 47-76 in Abhängigkeit vom Fragmentverhältnis. Jeweils 0.03 A₂₆₀-Einheiten Phe 47-76 wurden mit steigenden Mengen Phe 1-36 präinkubiert und mit angereicherter Phe-tRNA-Synthetase bei 20° aminoacyliert (6.8.). Die gestrichelte Linie deutet das äquimolare Gemisch an.

Phe 1-36 mit steigenden Mengen Phe 47-76 war diese maximale Beladung beim äquimolaren Mischungsverhältnis noch nicht erreicht. Die Möglichkeit einer teilweisen Inaktivierung des Fragments Phe 1-36 ist damit ausgeschlossen.

Die kinetische Untersuchung der Rekombination der Halbmoleküle (vgl. 4.2.) hat gezeigt, daß der Rekombinationsprozeß sehr schnell abläuft. Die geringe Akzeptoraktivität einiger Fragmentkombinationen läßt sich somit kaum durch unvollständige Rekombi-

nation erklären. Eher kommt dafür die Ausbildung inaktiver, unter den Testbedingungen stabiler Konformationen der rekombinierten Fragmente in Frage. Diese Deutung konnte experimentell gestützt werden (103).

Die Daten in Abb. 34 zeigen, daß die Akzeptoraktivität teilweise erhalten bleibt, wenn in der Anticodon- S_C -Schleife (A), in der hU-Schleife (B) oder der S-Region (C) der $tRNA^{Phe}$ Kettenbrüche vorliegen. Die Aminoacylierbarkeit der Kombination D), in der die Nucleotide 37-46 fehlen, zeigt, daß der Anticodon-Stamm und die S-Region der $tRNA^{Phe}$ keine wesentliche Funktion bei der Erkennung der Synthetase und bei der Aufrechterhaltung der aktiven Konformation der für die Beladung wichtigen Bereiche des $tRNA$ -Moleküls haben. Die Kombinationen E) und F), bei denen jeweils ein komplementärer Strang des hU- bzw. TYC-Stammes fehlte, waren völlig inaktiv. Diese Bereiche sind demnach für die Funktionsfähigkeit notwendig. Allerdings wurde nicht untersucht, ob bei den Fragmentgemischen E) und F) tatsächlich Rekombination stattgefunden hat. Die Aktivität der Kombinationen C) und D) zeigt jedoch, daß die Rekombination stattfinden kann, wenn sich zwischen den beiden Fragmenten nur die Basenpaare des Akzeptorstammes ausbilden können.

Die Fragmentkombination Phe 1-36 + Phe 38-76 hatte die gleiche Michaelis-Konstante wie intakte $tRNA^{Phe}$ ($K_M = 1.0 \times 10^{-7}$ M) (Abb. 36). Die Maximalgeschwindigkeit der Beladung war etwa 70 % niedriger als die der $tRNA^{Phe}$. Ähnliche Unterschiede in der Beladungsgeschwindigkeit der Kombinationen von $tRNA^{Phe}$ -Fragmenten bei unveränderter K_M wurden kürzlich beobachtet (103).

Offenbar werden die aktiven Kombinationen mit der gleichen Affinität wie $tRNA^{Phe}$ an die Synthetase gebunden. Die niedrige

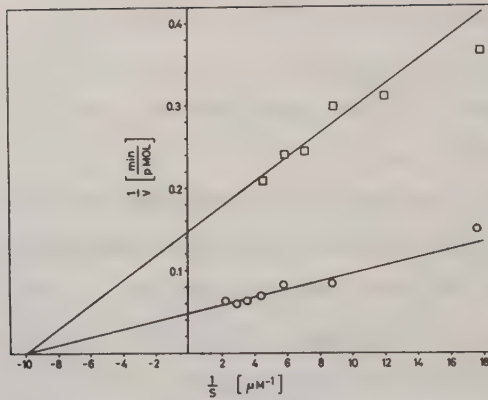


Abb. 36: Vergleich der Anfangsgeschwindigkeiten der Aminoacylierung von tRNA^{Phe} und Phe 1-36 + Phe 38-76 in der Auftragung nach Lineweaver-Burk.

tRNA^{Phe} (○) und Phe 1-36 + Phe 38-76 (□) wurden im Standard-Inkubationsgemisch (6.8.) mit 45 μ Einheiten angereicherter Phe-tRNA-Synthetase (6.15.2.) 0.5 min bei 20° inkubiert. Bei der Berechnung wurde für die Substratkonzentration (S) die Menge beladbarer tRNA^{Phe} (1200 pMol/A₂₆₀-Einheit) bzw. Hälftenkombination (500 pMol/A₂₆₀-Einheit des Gemischs) zugrunde gelegt.

Beladungsgeschwindigkeit deutet darauf hin, daß auch in den aktiven Fragmentkombinationen der Teil des tRNA-Moleküls, der für die Aminoacylierung wichtig ist, in einer ungünstigen Konformation vorliegt, so daß ein wesentlich geringerer Teil der Zusammenstöße mit der Synthetase als bei der intakten tRNA zur Übertragung der Aminosäure führt. Andererseits ist auch denkbar, daß die in nicht-beladbarer Konformation vorliegenden Kombinationen die Aminoacylierung der aktiven Kombinationen hemmen. Ein solches Verhalten wurde an denaturierten tRNAs beobachtet (86).

5.1.2. Kinetik der Aminoacylierung der tRNA^{Phe} in Gegenwart der Halbmoleküle.

Die beiden Halbmoleküle der tRNA^{Phe} waren allein nicht beladbar. Eine Bindung der einzelnen Halbmoleküle an die Synthetase ist damit nicht ausgeschlossen. Sie sollte sich aber bei der Aminoacylierung der tRNA^{Phe} in Gegenwart der einzelnen Halbmoleküle in einer kompetitiven Hemmung bemerkbar machen. Abb. 37 zeigt das Ergebnis derartiger Beladungsversuche in der Auftragung nach Lineweaver-Burk. Die bei Zusatz des Fragments Phe 38-76 erhaltene Gerade deutet eine schwache kompetitive Hemmung an. Die Erhöhung der Menge Phe 38-76 um das 2.5fache bewirkte keine weitere Zunahme der Hemmung. Bei der relativ großen Fehlerbreite dieses Versuchs sind die beobachteten Unterschiede in

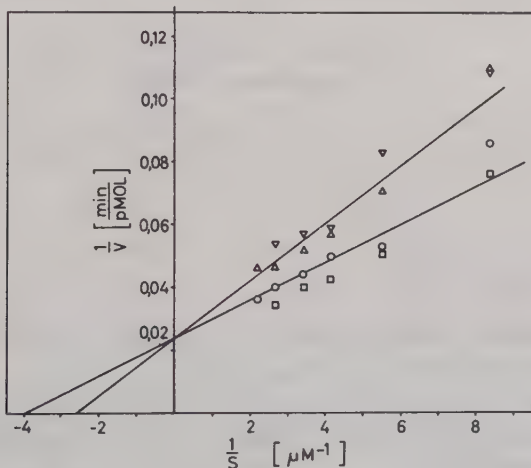


Abb.37: Anfangsgeschwindigkeit der Aminoacylierung der tRNA^{Phe} unter Zusatz von Halbmolekülen in der Auftragung nach Lineweaver-Burk.

Steigende Mengen tRNA^{Phe} wurden ohne Zusatz (O), mit je 0.28 A₂₆₀-Einheiten Phe 1-36 (□), mit je 0.1 A₂₆₀-Einheit Phe 38-76 (▽), und mit je 0.25 A₂₆₀-Einheiten Phe 38-76 (Δ) im Standardinkubationsansatz (6.8.) mit 100 μEinheiten angereicherter Phe-tRNA-Synthetase (6.15.2.) 1 min bei 20° inkubiert. Berechnung wie in Abb. 23.

den K_M -Werten zu gering, um daraus auf eine Bindung des Halbmoleküls an die Synthetase schließen zu können. Bei Zusatz des Fragments Phe 1-36 wurde eher eine schwache Stimulierung der Aminoacylierung der tRNA^{Phe} beobachtet. Sie findet ihre Erklärung in einem tRNA^{Phe} -Gehalt von 3-5 % der hier verwendeten Präparation des Fragments Phe 1-36.

5.1.3. Poly U-abhängige Bindung an Ribosomen aus *E. coli*.

tRNA^{Phe} , $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ und die Kombination der Halbmoleküle Phe.1-36 + Phe 38-76 wurden mit ^{14}C -Phenylalanin beladen und im Poly U-abhängigen Ribosomenbindungstest (104) untersucht.

	Gebundene ^{14}C -Phe-tRNA relativ zur eingesetzten Menge (%)	
	Poly U	Kontrolle
tRNA^{Phe}	98	5
$\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$	24	6
Phe 1-36 + Phe 38-76	20	12

Tabelle 7: Bindung beladener tRNA^{Phe} , $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ und Phe 1-36 + Phe 38-76 an Ribosomen aus *E. coli* B.

Zur Versuchsdurchführung s. 6.8. und 6.9.; Kontrollen enthielten Poly A statt Poly U. Die Ribosomen wurden hergestellt wie in 6.15.3. beschrieben

Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse. Die zwar geringe, aber signifikante Bindung der $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ war überraschend, da für sie früher keinerlei Bindung beobachtet worden war (27). Nach neueren Untersuchungen von R. Thiebe ist diese Diskrepanz, die wiederholt auftrat (vgl. Tabelle 8 in 5.2.), wahrscheinlich auf

unterschiedliche Wachstumsbedingungen der Bakterien oder verschiedene Bakterienstämme, aus denen die Ribosomen isoliert wurden, zurückzuführen. Mit dem Befund, daß die Hälftenkombination keine höhere Bindungsaktivität als $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ aufwies, erbrachte der Versuch jedoch das erwartete Ergebnis.

5.2. Untersuchung der PF-markierten tRNA^{Phe} .

Im Aminoacylierungstest waren $\text{tRNA}^{\text{Phe}}\text{-PF}$ und $\text{tRNA}^{\text{Phe}}\text{-PF-red}$ mit Phe-tRNA-Synthetase aus Hefe weitgehend beladbar (Tabelle 8). Auch $\text{tRNA}^{\text{Phe}}\text{-EB}$ war unter diesen Bedingungen beladbar; hier sind die Versuche noch nicht abgeschlossen. Die Geschwindigkeit der Aminoacylierung der $\text{tRNA}^{\text{Phe}}\text{-PF}$ und $\text{tRNA}^{\text{Phe}}\text{-PF-red}$ war niedriger als die der tRNA^{Phe} .

Bei der heterologen Aminoacylierung durch Synthetase aus *E. coli* K12 wurde von den beiden Verbindungen nur $\text{tRNA}^{\text{Phe}}\text{-PF}$ beladen. Der Wert von etwa 20 % Beladung, verglichen mit der Beladung durch die homologe Hefe-Synthetase, erhöhte sich auch bei längerer Inkubation nicht. Die heterologe Aminoacylierung der $\text{tRNA}^{\text{Phe}}\text{-PF}$ zeigte die gleiche Abhängigkeit von der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration wie die der tRNA^{Phe} (103).

Im Ribosomenbindungstest zeigten $\text{tRNA}^{\text{Phe}}\text{-PF}$ und $\text{tRNA}^{\text{Phe}}\text{-PF-red}$ beträchtliche Aktivität (Tabelle 8). Auch in diesem Versuch wurde eine gewisse Bindung der $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ an die Ribosomen beobachtet (vgl. 5.1.3.), obwohl die hier verwendeten Ribosomen mit 0.5 M NH_4Cl gewaschen waren, wie es in (103) beschrieben wurde; allerdings waren sie aus einem anderen *E. coli* Stamm isoliert.

	Aminoacylierung (pMol Phe/A ₂₆₀ -Einh.)	Ribosomenbindung (% der angebotenen ¹⁴ C-Phe-tRNA)		
Synthetase aus				
	Hefe	E.coli K12	Poly U	Kontrolle
tRNA ^{Phe}	1100	980	88	4
tRNA ^{Phe} (HCl)	1050	< 20	24	3
tRNA ^{Phe} -PF	1025	210	53	4
tRNA ^{Phe} -PF-red	880	< 20	57	7

Tabelle 8: Aktivitäten der PF-markierten tRNA^{Phe} in biochemischen Tests.

Die homologe Aminoacylierung wurde mit der angereicherten Phe-tRNA-Synthetase aus Hefe durchgeführt (6.8.), die heterologe wie in (103) in Gegenwart von 1M (NH₄)₂SO₄, wobei 35 min bei 37° inkubiert wurde. Präparative Beladung wie in 6.8. beschrieben; Phe-tRNA^{Phe}-PF wurde wegen der Säurelabilität der PF-Bindung bei pH 7 isoliert und sofort eingesetzt. Die Ribosomen aus E. coli K12 waren gewaschen wie in 6.15.3. beschrieben. Zur Durchführung des Ribosomenbindungstests s. 6.9.

5.3. Diskussion.

Die Aminoacylierungsversuche mit den verschiedenen Kombinationen der tRNA^{Phe}-Fragmente erbrachten als wesentlichen Befund, daß die Nucleotide 37-46 der tRNA^{Phe} für die Aminoacylierung nicht notwendig sind (Abb. 34). Auch bei tRNA^{Ser} aus Hefe ist der entsprechende Sequenzbereich entbehrlich (105). Bei tRNA^{Phe} kann sogar der ganze Anticodon-Arm fehlen, ohne daß die Akzeptoraktivität verschwindet (103,106). Dagegen waren die Kombinationen, in denen der hU- oder TYC-Stamm nicht intakt war, völlig inaktiv. Imura et al. (107) beschrieben für eine Kombination von Fragmenten der tRNA^{Ala} aus Hefe, in der nur noch der Akzeptor-

stamm als gepaarter Bereich vorhanden war, eine Akzeptoraktivität von etwa 5 %; allerdings gaben sie keine Reinheitskriterien für die Fragmente an. Bei tRNA^{Val} aus Hefe führte schon das Herausspalten von zwei Nucleotiden aus dem Anticodon und auch die Öffnung des ersten Basenpaares neben der Anticodon-Schleife durch Entfernung eines Nucleotids zum vollständigen Verlust der Akzeptoraktivität (108).

Da weder für intakte noch für modifizierte tRNA die Struktur bekannt ist, läßt sich bei keiner der inaktiven Fragmentkombinationen entscheiden, ob die Abspaltung einer für die Wechselwirkung mit der Synthetase wichtigen Nucleotidsequenz oder eine Veränderung der Konformation für den Verlust der Akzeptoraktivität verantwortlich ist. Daß Konformationseffekte bei der Aminoacylierung von Fragmentkombinationen eine große Rolle spielen, geht daraus hervor, daß auch aktive Kombinationen immer nur zum Teil und wesentlich langsamer als die intakte tRNA beladen wurden.

Von den verschiedenen Hypothesen, die für die Synthetaseerkennungsregion der tRNAs vorgeschlagen wurden (109-111), läßt sich auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit eine ausschließen, nach der die S-Region die Synthetaseerkennungsstelle aller tRNAs sein soll (110). Zu den anderen Hypothesen lassen die Ergebnisse keine Aussagen zu, da in keiner der aminoacylierbaren Fragmentkombinationen die als Erkennungsregionen postulierten tRNA-Bereiche fehlten.

Die hohe Aktivität der PF-markierten tRNA^{Phe} im Aminoacylierungstest mit Phe-tRNA-Synthetase aus Hefe und die beträchtliche Aktivität im Ribosomenbindungstest lassen den Schluß zu, daß

die markierten tRNAs eine Struktur aufweisen, die der der unmodifizierten tRNA^{Phe} sehr ähnlich ist. Vorläufige Messungen der Polarisierung der Fluoreszenz, die von R. Rigler durchgeführt wurden, haben gezeigt, daß die Farbstoffe PF und EB in den tRNA^{Phe}-Farbstoff-Verbindungen relativ zum tRNA-Molekül nur wenig beweglich sind. Aus diesen Befunden geht hervor, daß die kovalent an tRNA^{Phe} gebundenen Farbstoffe als Indikatoren für die Untersuchung der Struktur der tRNA^{Phe} und ihrer Wechselwirkungen mit anderen Makromolekülen mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen geeignet sind.

Die Spektren der kovalent gebundenen Farbstoffe ließen auf starke Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffen und den benachbarten Adeninbasen schließen. Die Anticodon-Schleife der markierten tRNA^{Phe} weist demnach eine geordnete Struktur auf (vgl. dazu 3.7. und 3.8.). Die hohe Aktivität der PF-markierten tRNA^{Phe} im Ribosomenbindungstest ist nun ein Hinweis darauf, daß auch die Anticodon-Schleife der nativen tRNA^{Phe} eine derartige Konformation aufweist. Mit der Annahme einer starren Konformation der Anticodon-Schleife wurden auch die Befunde bei der Untersuchung der Mg⁺⁺-katalysierten Spaltung gedeutet (vgl. 2.2.5. und die dort angegebene Literatur). In welchem Umfang die Gesamtkonformation der tRNA^{Phe} von der Abspaltung der Base Y⁺ und dem Einbau des PF mitbetroffen ist, läßt sich nicht entscheiden. In diesem Zusammenhang ist auch die Aminoacylierbarkeit der tRNA^{Phe}-PF durch die Synthetase aus E. coli interessant. Der Befund, daß nur etwa 20 % der tRNA^{Phe}-PF heterolog aminoacylierbar waren, läßt sich am besten mit der Annahme verschiedener, aktiver und inaktiver, Konformationen der tRNA^{Phe}-PF deuten. Hinweise auf das Vor-

liegen verschiedener, stabiler Konformationen der tRNA^{Phe}-Farbstoff-Verbindungen waren auch aus dem chromatografischen Verhalten der Verbindungen zu entnehmen (vgl. 3.5.). Damit zeigt der Befund wieder, daß die Synthetase aus E. coli andere Anforderungen an die Struktur der tRNA^{Phe} stellt als die homologe Hefe-Synthetase.

Zu der Frage, welche Rolle die stark modifizierte Base Y⁺ (11,12) für die biologischen Funktionen der tRNA^{Phe} spielt, haben die hier beschriebenen Versuche ergeben, daß Y⁺ selbst bei der Bindung der tRNA^{Phe} an den Poly U-Ribosomen-Komplex und bei der heterologen Aminoacylierung keine spezifische Bedeutung hat. Der Befund, daß Y⁺ bei diesen Funktionen durch PF ersetzt werden kann, zeigt vielmehr, daß eine Aufgabe der Base neben dem Anticodon darin besteht, die Ausbildung einer geordneten Konformation der Anticodon-Schleife und vielleicht des ganzen tRNA-Moleküls zu ermöglichen.

Man sollte allerdings annehmen, daß es auch Funktionen der tRNA^{Phe} gibt, für die die Anwesenheit von Y⁺ selbst notwendig ist. Da weder die Aminoacylierung noch die Bindung an die Ribosomen spezifisch von Y⁺ abhängig sind, könnten zu diesen Funktionen die folgenden Schritte der Proteinsynthese gehören, z.B. der Aminoacyl- bzw. Peptidyl-Transfer oder der Translokationsschritt. Die Untersuchung der in-vitro-Synthese von Polyphenylalanin mit PF-markierter tRNA^{Phe} könnte zur Klärung dieser Frage beitragen..

6. Beschreibung der Versuche

6.1. Chemische tRNA-Spaltungen.

6.1.1. Spaltung der tRNA^{Phe}(HCl) und des Hexanucleotids-Y⁺.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Spaltungen mit Anilin in Anlehnung an (41) wie folgt durchgeführt (Standard-Anilinbehandlung): Die Suspension von 0.42 ml Anilin (bei präparativen Ansätzen frisch destilliert) in etwa 5 ml Wasser wurde mit HCl auf pH 5 gebracht und die Lösung auf 10 ml aufgefüllt. 2 Teile der Anilin-Lösung wurden zu einem Teil der wässrigen Lösung (pH 5) der tRNA^{Phe}(HCl) (15 - 200 A₂₆₀-Einheiten/ml) bzw. des Hexanucleotids-Y⁺ (2 - 10 A₂₆₀-Einheiten/ml) gegeben. Die Mischung wurde 4 Std. bei 25° inkubiert (präparative Ansätze unter Lichtabschluß in Stickstoffatmosphäre). Nach der Reaktion wurde ein Teil des Anilins durch Äther-Extraktion entfernt. Die weitere Aufarbeitung richtete sich nach dem Verwendungszweck. Die Spaltprodukte der tRNA^{Phe}(HCl) wurden bei präparativen Ansätzen durch dreimalige Alkoholfällung gereinigt und durch Säulenchromatografie getrennt (vgl. Abb.6). Für analytische Untersuchungen auf Disk-Elektrophorese wurden die Proben nach der Äther-Extraktion (und evtl. Alkoholfällung) mit Bromphenolblau-Lösung (6.10.) versetzt. Die Spaltprodukte des Hexanucleotids-Y⁺ wurden durch Papier-elektrophorese getrennt; präparative Spaltungen wurden 5fach verdünnt und säulenchromatografisch getrennt (6.7.2.). Die Reaktionen mit anderen Aminen wurden analog durchgeführt.

6.1.2. Spaltung an der m⁷G-Position.

Die von zweiwertigen Kationen befreiten tRNAs (6.2.)

(10 A₂₆₀-Einheiten/ml in analytischen, 50 A₂₆₀-Einheiten/ml in präparativen Ansätzen) wurden in 0.1M Tris-HCl, pH 9.5, 4.5 Std. bei 50° inkubiert. Nach zwei Äthanol-fällungen wurden die Produkte (10 - 25 A₂₆₀-Einheiten/ml) in 0.3M Anilin, pH 3,5, 4 Std. bei 50° inkubiert (hierzu und zur Aufarbeitung s. 6.1.1.). Die Spaltprodukte der tRNA^{Phe}(HCl) wurden säulenchromatografisch getrennt (vgl. Abb. 14).

6.1.3. Mg⁺⁺-katalysierte Spaltung der tRNA^{Phe}.

30 A₂₆₀-Einheiten/ml tRNA^{Phe} (nach 6.2. dialysiert) wurden in 0.05M Tris-HCl, pH 9.5, 0.05M MgCl₂ (Mg⁺⁺/P = 15) 2.5 Std. bei 50° inkubiert. Nach dem Ansäuern mit Essigsäure (etwa pH 5) wurden die Produkte mit Alkohol gefällt. Der Niederschlag wurde in 0.3 ml Wasser gelöst und mit 0.3 ml Bromphenolblau-Lösung versetzt; die Trennung der Fragmente erfolgte durch präparative Disk-Elektrophorese (6.10.).

6.1.4. Abspaltung des 3'-terminalen Nucleosids aus tRNA (Whitfeld-Abbau).

Die Methode von (41) wurde etwas verändert: Nach Phenol-Extraktion wurde tRNA^{Phe} (30 A₂₆₀-Einheiten/ml) oder Phe 1-36 (15 A₂₆₀-Einheiten/ml) in 0.1M Na-Acetat, pH 5.3, mit 2.5 mM NaJO₄ bei 0° im Dunkeln 30 min inkubiert. Die oxidierte RNA wurde mit Äthanol gefällt und durch zweimaliges Umfällen aus 0.1M Na-Acetat, pH 5.3, gereinigt. Anschließend erfolgte eine Standard-Anilinbehandlung (6.1.1.).

6.1.5. Alkalische Totalhydrolyse von Oligonucleotiden.

Die Oligonucleotide wurden in 0.3M NaOH 14 Std. bei 37° inkubiert. Zur Entfernung von Na⁺ wurde mit dem Kationenaustauscher AG 50 W x2 (H⁺- Form) behandelt. Nach Filtration wurde das Nucleotidgemisch papierelektrophoretisch aufgetrennt.

6.2. Abtrennung zweiwertiger Kationen von tRNA (94).

Nach Phenolextraktion und Alkoholfällung wurde die tRNA (20 - 100 A₂₆₀-Einheiten/ml) bei 4° dreimal 6 - 10 Std. gegen 1M NaCl, 5 mM EDTA, pH 7, und dreimal gegen Wasser dialysiert.

Als Kriterium für vollständige Abtrennung zweiwertiger Kationen wurde gewertet, wenn die tRNA bei der Alkalibehandlung intakt blieb (6.1.2.). Danach war die Verwendung von NaCl "suprapur" nicht notwendig. Es wurden nur bei der Probenvorbereitung für die Aufnahme der Schmelzkurven verwendet (Kap. 4). Der Mg⁺⁺-Gehalt dieser Proben wurde durch Atomabsorptionsmessungen zu weniger als 1 Mg⁺⁺/tRNA bestimmt (95).

6.3. Einbau von Fluoreszenzfarbstoffen in tRNA^{Phe}(HCl).

Wegen der Lichtempfindlichkeit des PF wurden alle Versuche mit den Farbstoffen und den tRNA-Farbstoff-Verbindungen möglichst unter Lichtausschluß durchgeführt.

6.3.1. Proflavin.

13 A_{260} -Einheiten/ml $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ wurden mit $2.6 \mu\text{Mol/ml}$ PF (125facher Überschuß) in 0.1M Na-Acetat, pH 4.3, bei 37° eine Std. inkubiert. Anschließend wurde $\text{Tris-H}_2\text{SO}_4$ zugegeben (0.1M) und mit 1N NaOH pH 7.5 eingestellt. Die Mischung wurde mit wassergesättigtem Phenol extrahiert, bis die Phenolphase farblos war (3 - 4 mal). Die wässrige Phase wurde mehrmals mit Äther extrahiert. Wenn nötig, konnte die markierte tRNA durch Alkoholfällung bei pH 7.5 isoliert werden; auch beim Aufbewahren der Lösung bei -18° traten innerhalb von einigen Wochen keine merklichen Verluste an gebundenem Farbstoff ein.

6.3.2. Ethidiumbromid

11.5 A_{260} -Einheiten/ml $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ wurden mit $7.7 \mu\text{Mol/ml}$ EB (400facher Überschuß) umgesetzt und aufgearbeitet wie in 6.3.1.

6.3.3. Reduktion der tRNA^{Phe} -Farbstoff-Verbindungen.

10 - 20 A_{260} -Einheiten tRNA^{Phe} -PF bzw. tRNA^{Phe} -EB wurden mit 20 mg NaBH_4 in 1 ml 0.02M Tris HCl, pH z.5, 5 mM MgCl_2 15 min bei 0° inkubiert. Nach Zugabe von Essigsäure bis etwa pH 4 wurde 4 Std. bei 37° inkubiert, um evtl. noch vorhandene un-reduzierte Verbindungen zu hydrolysieren. Die Lösung wurde dann gegen Wasser dialysiert und mit Phenol und Äther extrahiert.

6.4. Reduktionen mit Natriumborhydrid.

Reduktionen mit NaBH_4 wurden unter verschiedenen Bedingungen vorgenommen:

Methode A: Zur Reduktion der freien Ribose in $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{HCl})$ wurden bis zu 100 A_{260} -Einheiten/ml mit 20 mg/ml NaBH_4 in 0.5 M Phosphatpuffer, pH 7.5, bei 25° 3 Std. inkubiert. Unter diesen Bedingungen wurde auch Dihydrouracil teilweise angegriffen (vgl. 2.1.3.5.).

Methode B: Das Hexanucleotid- Y^+ und dessen Anilinspaltprodukte wurden in Konzentrationen von 10 - 20 A_{260} -Einheiten/ml mit 20 mg/ml $^3\text{H-NaBH}_4$ in 0.15 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, pH 8.5, 3 Std. bei Raumtemperatur behandelt.

Analog wurden Ribose und Ribose-5-phosphat reduziert.

Methode C: Zur Reduktion von Dihydrouracil in tRNA oder Fragmenten wurden die Bedingungen von (48) angewendet. In jedem Fall wurde nach der Reaktion mit 6 N Essigsäure auf etwa pH 4 gebracht. Reduzierte tRNA wurde durch wiederholte Alkoholfällung und Dialyse gereinigt. Reduzierte Oligonucleotide wurden durch Säulenchromatografie an DEAE-Cellulose gereinigt bzw. getrennt. Die Lösungen von reduzierter Ribose bzw. Ribose-5-phosphat wurden im Vakuum eingetrocknet und die Produkte durch Chromatografie oder Papierelektrophorese isoliert.

6.5. Abspaltung terminaler Phosphatgruppen von tRNA. Bestimmung des freigesetzten anorganischen Phosphats.

Die 5'- und 3'-terminalen Phosphatgruppen von tRNA, tRNA-Fragmenten, Oligo- und Mononucleotiden wurden mit alkalischer

Phosphatase aus *E. coli* abgespalten (112). Dazu wurden die Substrate (10 - 50 nMol/ml) mit 0.05 - 0.15 Einheiten/ml PME in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.3, 30 min bei 60° inkubiert. Analytische Ansätze wurden dann direkt papierchromatografisch aufgetrennt; bei präparativen Ansätzen wurde das Protein mit Phenol extrahiert und die tRNA durch Alkoholfällung gereinigt.

Das freigesetzte Phosphat wurde nach (113,114) bestimmt. Es konnten noch etwa 4 nMol Phosphat erfaßt werden. Alle verwendeten Glasgeräte mußten durch Reinigung mit Chromschwefelsäure von Resten phosphathaltiger Detergentien befreit werden.

6.6. Nuclease-Spaltungen.

6.6.1. Die Spaltungen von Oligonucleotiden mit Pankreas-RNase, Schlangengift-PDE und PDE/PME wurden nach (115) durchgeführt, die mit Milz-PDE nach (105).

6.6.2. Totalspaltung von tRNA und tRNA-Fragmenten mit T₁-RNase.

15 - 30 A₂₆₀-Einheiten tRNA bzw. entsprechende Mengen der Fragmente wurden in 2 ml Wasser mit 100 Einheiten T₁-RNase bei pH 7.5 (Autotitrator) und 45° inkubiert, bis die Aufnahme von Lauge (0.01 N NaOH) beendet war (etwa 2 Std.). Das Gemisch wurde mit Harnstoff versetzt (etwa 7 M) und chromatografiert (6.7.1.).

6.7. Säulenchromatografie von Oligonucleotiden.

6.7.1. Chromatografie von T_1 -RNase-Hydrolysaten.

Das Spaltungsgemisch (6.6.2.) wurde auf eine DEAE-Cellulose-Säule (0.3 x 70 cm) aufgetragen und bei Raumtemperatur mit einem Gradienten von je 250 ml 0.01 und 0.3 M NaCl in 0.01 M Tris-HCl, pH 7.5, 7 M Harnstoff eluiert (47). Um eine Durchflußgeschwindigkeit von 5 - 10 ml/Std. zu erreichen, mußte die DEAE-Cellulose vor Gebrauch mehrere Male geschlämmt werden. Die Oligonucleotide wurden ähnlich wie in (116) aus dem Eluat isoliert; die genaue Beschreibung der Prozedur findet sich in (47).

6.7.2. Chromatografie an DEAE-Cellulose mit $(NH_4)_2CO_3$ -Gradienten.

10 - 50 A_{260} -Einheiten des Oligonucleotidgemischs wurden auf DEAE-Cellulose-Säulen (1 x 10 cm) aufgetragen und bei 4° mit einem Gradienten von je 150 ml 0.01 und 0.35 M $(NH_4)_2CO_3$, pH 8.6 (mit CO_2 eingestellt) eluiert.

Die gewünschten Fraktionen wurden im Vakuum eingeengt (30°); Reste von $(NH_4)_2CO_3$ wurden durch mehrmaliges Eintrocknen im Exsiccator über P_2O_5/KOH entfernt.

6.8. Einbau von Phenylalanin in $tRNA^{Phe}$ und Fragmentkombinationen.

Die Prozedur ist in (117) beschrieben.

Für die Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$ enthielt der Inkubationsansatz (0.1 ml): 0.03 - 0.07 A_{260} -Einheiten $tRNA^{Phe}$, 10 mM ATP,

15 mM MgCl_2 , 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, $0.005 \mu\text{Mol L-}^3\text{H-}$ oder $^{14}\text{C-Phenylalanin}$ (oder $0.01 \mu\text{Mol D,L-Phe}$) und etwa $0.2 A_{260}$ -Einheiten eines rohen Gemischs der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (6.15.2.) oder $100 \mu\text{Einheiten}$ einer angereicherten Phe-tRNA-Synthetase (6.15.2). Wenn nicht anders angegeben, wurde 15 min bei 37° inkubiert. Fragmentgemische wurden zunächst in $0.055 \text{ ml } 10 \text{ mM Tris-HCl, pH 7.5, } 5 \text{ mM MgCl}_2$ bei 37° 90 min präinkubiert. Dann wurden die Komponenten des obigen Ansatzes zugegeben (Endvolumen 0.105 ml) und mit der angereicherten Phe-tRNA-Synthetase 30 min bei 20° inkubiert.

Präparative Ansätze enthielten bis zu $10 A_{260}$ -Einheiten tRNA^{Phe} und $0.5\text{--}3 \text{ mEinheiten}$ der angereicherten Phe-tRNA-Synthetase in 0.5 ml des obigen Ansatzes. Nach der Inkubation wurde das Gemisch mit $0.1 \text{ M Na-Acetat/Essigsäure}$ auf pH 5 gebracht und mit Phenol extrahiert. Die beladene tRNA wurde durch Gelfiltration über Sephadex G25 in $0.02 \text{ M Na-Acetat, pH 5}$, isoliert.

6.9. Ribosomenbindungstest.

Die Bindung von $^{14}\text{C-Phe-tRNA}$ an Ribosomen aus *E. coli* B oder K 12 (6.15.3.) wurde nach der Methode von Leder und Nirenberg (104) getestet, wie in (27) beschrieben. Es wurde 45 min bei 25° inkubiert.

6.10. Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgelen.

Die Durchführung der Disk-Elektrophorese ist ausführlich beschrieben in (105).

Analytische Trennungen von tRNA-Fragmenten wurden in 0.3 cm dicken Trenngelen aus $16 \% \text{ Acrylamid}$ und $1.3 \% \text{ Bisacrylamid}$ in 7 M Harnstoff vorgenommen; das Tris/Veronal-Puffersystem

mit pH 8.9 (118) wurde dafür verwendet. Aliquots von 0.05 - 0.1 A_{260} -Einheiten tRNA oder Fragmente (10 - 20 μ l) wurden mit dem gleichen Volumen einer 0.005 % Lösung von Bromphenolblau in 7 M Harnstoff, 50 % Saccharose versetzt und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Nach der Trennung wurden die Banden durch Anfärben mit "all-stain"-Farbstoff sichtbar gemacht.

Präparativ wurden tRNA-Fragmente in 1 cm dicken Trenngelen aus 11 % Acrylamid und 0.5 % Bisacrylamid im gleichen Puffersystem getrennt. Nach kurzem Anfärben mit Toluidinblau wurden die gefärbten Gelzonen ausgeschnitten und zerkleinert. Die Fragmente wurden dann mit Wasser/Phenol aus den Gelpartikeln eluiert und durch Dialyse und Alkoholfällung oder durch Chromatografie an DEAE-Cellulose gereinigt.

Die densitometrische Auswertung der analytischen Geltrennungen wurde nach dem Entfärben des Untergrundes (Belichten mit einer Tageslichtlampe) durch Messung der Extinktion bei 546 nm vorgenommen. Bei Einhaltung bestimmter Konzentrationsgrenzen und bestimmter Färbe- und Entfärbebedingungen ist die Extinktion (Fläche eines Gipfels im Densitogramm) im hier untersuchten Kettenlängenbereich proportional der Nucleotidmenge (105). Quantitative Angaben sind aber nur relativ zu anderen Banden desselben Gelstreifens möglich. Die Menge eines Fragments wird deshalb immer relativ zur Gesamtfläche aller Gipfel des Densitogramms angegeben.

Die elektrophoretische Beweglichkeit von Oligo- und Polynucleotiden ist in gewissen Grenzen eine lineare Funktion des Logarithmus ihrer Kettenlänge, gleiche Nettoladung und vollständige De-

naturierung vorausgesetzt. Auf Grund dieser Tatsache wurde aus der Beweglichkeit von tRNA-Fragmenten relativ zu Bromphenolblau (R_B -Wert) die Kettenlänge der Fragmente abgeschätzt. Besonders bei kleineren Oligonucleotiden spielen dabei allerdings Unterschiede in der Anzahl der endständigen Phosphatgruppen eine große Rolle, da sie die Nettoladung stark beeinflussen. Diese Fragen sind in (105) ausführlich abgehandelt; dort finden sich auch die entsprechenden Eichgeraden.

6.11. Dünnschicht- und Papierchromatografie. Zuckernachweis.

Nucleoside und Zuckerderivate wurden durch Chromatografie auf Cellulose-Dünnschichtplatten (Merck, Darmstadt) oder Papier (Schleicher und Schüll; 2043 b Mg1) getrennt.

Folgende Systeme wurden verwendet (Volumenteile):

- A) Essigester/ 1-Propanol/Wasser (4/1/2, Oberphase) (119);
- B) 2-Propanol/DMF/konz. NH_3 (65/25/10) (120);
- C) 2-Propanol/Wasser/konz. NH_3 (7/1/2);
- D) 2-Propanol/konz. HCl /Wasser (65/16.7/18.3);
- E) Methanol/Wasser (7/3) (120).

Auf DC-Platten wurde Ribose durch Besprühen mit einer Lösung von p-Anisidin in n-Butanol (121) und Erhitzen als brauner Fleck sichtbar gemacht. Der Nachweis auf Papier beruhte auf der Oxidation von Diolgruppen mit Perjodsäure und der anschließenden Reaktion nicht verbrauchter Perjodsäure mit Benzidin unter Bildung eines blauen Farbstoffs (122). Dabei ergaben Ribose und Ribose-5-phosphat einen gelblichen, Ribit, Ribit-5-phosphat, Nucleoside und Nucleosid-5'-phosphate einen weißen Fleck auf blauem Grund. Mit diesem Nachweis konnten noch etwa 5 nMol erfaßt werden.

6.12. Papierelektrophorese.

Die elektrophoretische Trennung von Oligonucleotiden, Nucleotiden und Zuckerphosphaten auf Papier (Schleicher und Schüll; 2043b Mgl) wurde nach (123) bei Feldstärken von 40 - 50 V/cm und Stromstärken von 50 - 100 mA in folgenden Puffern vorgenommen:

pH 2.7: 0.18 M Ammoniumformiat; pH 3.5: 0.065 M Ammoniumformiat;
pH 7.0: 0.025 M Ammoniumacetat; alle mit 1.7 mM EDTA.

Die Substanzen wurden mit Wasser aus dem Papier eluiert. Die UV-Spektren wurden gegen das Eluat einer gleich großen Papierzone neben der betreffenden Substanz gemessen.

6.13. Radioaktivitätsmessungen.

Radioaktivität auf Filtern wurde in Toluolszintillator (4 g Omni-fluor in 1 l dest. Toluol), in Flüssigkeiten mit Bray-Szintillator (124) gemessen.

Zur Bestimmung der Radioaktivität in Gelstreifen wurden 2 mm breite Gelstücke zerkleinert und mit 0.5 ml 1 N NaOH einige Std. bei 50° inkubiert. Durch Zugabe von 0.5 ml 1 N HCl und 0.2 ml 1 M Tris, pH 7.5, wurde neutralisiert (pH 6-8). Zur Messung wurden 10 ml Bray-Szintillator zugegeben.

6.14. Apparative Hilfsmittel.

Für Absorptionsmessungen wurden die Spektralfotometer PMQ II und PL 4 der Fa. Zeiss und ein registrierendes Spektralfotometer Cary 15 (Varian Ass.) benutzt. Fluoreszenz wurde mit einem Hitachi MPF- 2 A Fluoreszenzspectrometer (Perkin-Elmer) gemessen. Für die Szintillationsmessung dienten die Tri-Carb-Modelle 3310

und 3375 (Packard Instruments). Die Radioaktivität auf Chromatogrammen wurde mit einem Dünnschicht-Scanner Modell LB 2722 der Fa. Berthold, Wildungen, bestimmt. Für die Disk-Elektrophorese wurde eine Elektrophorese-Kammer EC 490 (EC Apparatus Corp.) verwendet. Für pH-Messungen wurden Messketten und pH-Meter der Fa. Radiometer, Kopenhagen, benutzt; zur Konstanthaltung des pH-Werts in ungepufferten Lösungen diente ein Autotitrator (Radiometer). Gelstücke wurden mit dem Ultraturrax TP 18/2 (Jahnke und Kunkel, Staufen) zerkleinert.

6.15. Materialien.

6.15.1. tRNA und tRNA-Fragmente

Die spezifischen tRNAs wurden aus Brauereihefe tRNA (Boehringer, Mannheim) isoliert: tRNA^{Phe} nach (125), Akzeptoraktivität 1100 - 1400 pMol Phe/A₂₆₀-Einheit; tRNA^{SerI/II} von H.G. Zachau und S. Notz nach (115), Akzeptoraktivität 900 - 1100 pMol Ser/A₂₆₀-Einheit. tRNA^{Phe}(HCl) wurde wie in (27) hergestellt, ihre Akzeptoraktivität war 900-1200 pMol Phe/A₂₆₀-Einheit. Die Halbmoleküle der tRNA^{Phe} aus Weizen (45) und das Fragment Phe 58-76 (18) stammten von R. Thiebe. Das Hexanucleotid Gm-A-A-Y-A-Ψ und das Hexanucleotid-Y⁺ wurden aus tRNA^{Phe} hergestellt (27). 1 A₂₆₀-Einheit ist die Menge tRNA oder tRNA-Fragment, die in 1 ml Puffer (pH 7, Mg⁺⁺) gelöst die Extinktion 1 bei 260 nm ergibt.

6.15.2. Enzyme.

Das rohe Gemisch der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (EC 6.1.1.) und 200fach angereicherte Phe-tRNA-Synthetase (EC 6.1.1.16.) mit der spezifischen Aktivität von 50 - 80 mEinheiten/mg (126) aus Brauereihefe wurden von R. Hirsch und R. Lamm hergestellt. Eine rohe Fraktion der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen aus *E. coli* K12 wurde von R. Thiebe (102) zur Verfügung gestellt.

Alkalische Phosphatase aus *E. coli* (EC 3.1.3.1.) (Worthington Biochemical Corp.) wurde von S. Notz und H.G. Zachau gereinigt (127) und hatte eine spezifische Aktivität von 40 Einheiten/mg (128). Phosphodiesterase (EC 3.1.4.1.) aus Schlangengift (*Crotalus adamanteus*) wurde von H. Feldmann isoliert; die Aktivität wurde nach (129) bestimmt.

Phosphodiesterase aus Schweinemilz wurde von P. Philippsen nach (130) teilweise angereichert (105).

T_1 -RNase (EC 3.1.4.8.) stammte von Sankyo, Tokio; bei der Verwendung wurde die Aktivitätsangabe (131) des Herstellers zugrunde gelegt. Pankreas-RNase (EC 2.7.7.16) (Boehringer, Mannheim) hatte, nach Angaben des Herstellers, eine spezifische Aktivität von 40 Einheiten/mg (132).

6.15.3. Ribosomen aus *E. coli*.

Die Ribosomen aus *E. coli* wurden isoliert nach (133) und fünfmal mit dem angegebenen Standardpuffer (0.01 M Tris, pH 7.8, 0.014 M Mg - Acetat, 0.06 M KCl, 0.006 M 2-Mercaptoäthanol) gewaschen. Bei der Reinigung der Ribosomen aus *E. coli* K 12 (E. Merck, Darmstadt) enthielt der Puffer bei der vierten Waschung zusätzlich 0.5 M NH_4Cl .

6.15.4. Material für die Säulenchromatografie.

DEAE-Cellulose (DEAE-SH, Kapazität 0.6- 1.2 mÄq/g; Serva Entwicklungslabor, Heidelberg) wurde nach (134) gebrauchsfertig gemacht und durch SchlÄmmen von feinen Partikeln befreit.

BD-Cellulose wurde nach (135) hergestellt oder fertig bezogen (Serva). Sie wurde vor Gebrauch intensiv mit 1.5 M NaCl, 20 % Äthanol gewaschen.

DEAE-Sephadex A25 (Kapazität 3.5± 0.5 mÄq/g; Pharmacia, Uppsala) wurde nach dem Quellen in Wasser mit dem jeweiligen Puffer (hohe NaCl-Konzentration) gewaschen und dann mit dem Startpuffer Äquilibriert.

Sephadex G25 (Pharmacia) wurde nach dem Quellen in 0.05 M Phosphatpuffer, pH 6.8, 3 Std. gekocht, mit heißem Wasser gewaschen und mit dem gewünschten Puffer Äquilibriert.

Die Ionenaustauscherharze Bio Rad AG 50 W und AG 1 wurden von Calbiochem, Los Angeles, bezogen und nach den Herstellervorschriften in die jeweils benötigte Form gebracht. Die Waschprozedur wurde kurz vor der Verwendung wiederholt.

6.15.5. Reagentien.

^{14}C -Phenylalanin mit verschiedenen spezifischen Radioaktivitäten wurde von The Radiochemical Centre, Amersham, bezogen, ^3H -NaBH₄ (200 Ci/Mol) und Omnifluor von New England Nuclear Corp., Boston.

Die Substanzen für die Gelelektrophorese: Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid, Tetramethylenetetramin, Veronal, Bromphenolblau und Toluidinblau stammten von Serva Entwicklungslabor, Heidelberg. Der Trimethinfarbstoff 1-Äthyl-2(3-(1-Äthyl-naphtho

(1,2d)thiazolin-2-yliden)2-methylpropenyl)naphtho(1,2d)thiazoliumbromid ("all-stain"-Farbstoff) zum Anfärben von Gelen war ein Produkt der Eastman Kodak Co., Rochester.

Anilin (p.a., Merck, Darmstadt) wurde durch zweimalige Destillation über Zinkstaub bei 10 - 20 Torr unter Stickstoff gereinigt; bei präparativen Ansätzen wurde die zweite Destillation unmittelbar vor der Verwendung vorgenommen. N-Methylanilin (p.a., Merck) wurde ebenso destilliert; nach der gaschromatografischen Analyse enthielt es dann immer noch 0.5 % Anilin. Proflavin (als Sulfat von Fluka AG, Buchs, bezogen) wurde durch mehrmaliges Umkristallisieren der freien Base aus Äthanol/Wasser gereinigt; es war dann einheitlich auf der Dünnschichtchromatografie. Ethidiumbromid (Serva Entwicklungslabor, Heidelberg) war einheitlich auf der Papierelektrophorese. Poly U und Poly A stammten von Miles Laboratories, Elkhart. ATP (Dinatriumsalz) war ein Produkt der Zellstoffabrik Waldhof, Mannheim; Mononucleotide, Nucleoside und Ribit waren von Sigma Chemical Comp., St. Louis; Ribose-5-phosphat (Bariumsalz) von Beehringer Mannheim. NaBH_4 (zur Synthese) und Harnstoff (reinst) sowie alle anderen Reagentien (p.a.) stammten von E. Merck, Darmstadt.

7. Zusammenfassung.

Die chemische Spaltung einer Nucleinsäure an den Positionen von Zuckerresten mit freier Aldehydgruppe (22) setzt die Abspaltung einzelner Basen voraus. Die bisher beschriebenen Anwendungen dieser Methode zur Spaltung von tRNA beruhten auf der Abspaltung der häufig vorkommenden Uracilbasen (25,26) und waren damit unspezifisch. Ausgangspunkt für die in der vorlie-

genden Arbeit beschriebenen Versuche war der Befund, daß die Base Y^+ aus $tRNA^{Phe}$ durch saure Hydrolyse abgespalten werden kann, wobei der Riboseanteil des Nucleosids Y, der nun eine freie Aldehydgruppe trägt, in der gebildeten $tRNA^{Phe}(HCl)$ verbleibt (27).

Durch eine basenkatalysierte Spaltung der 3-Phosphorsäure-esterbindung der Ribose mit freier Aldehydgruppe konnten aus $tRNA^{Phe}(HCl)$ die Halbmoleküle Phe 1-36 und Phe 38-76 in quantitativer Reaktion erhalten werden (Abb. 2). Für den Ablauf der Spaltung mit Anilin wird ein β -Eliminierungsmechanismus vorgeschlagen (Abb. 10).

Das gleiche Reaktionsprinzip konnte auch für eine Spaltung der $tRNA^{Phe}$ an der Position des 7-Methylguanosins angewendet werden. Es wurde nachgewiesen, daß die für freies m^7G bekannte Umwandlung mit Alkali in ein 4-Ribosylaminopyrimidin-Derivat (57) auch am m^7G in $tRNA^{Phe}$ stattfindet und daß das Produkt eine säurelabile N-glykosidische Bindung aufweist (Abb. 11).

Die Spaltung der RNA-Kette an der Position des abgespaltenen 7-Methylguanosins lieferte die Fragmente Phe 1-45 und Phe 47-76, bzw., unter gleichzeitiger Spaltung an der Y-Position, die Fragmente Phe 1-36, Phe 38-45 und Phe 47-76 (Abb. 12). Diese Spaltung findet in einem Bereich des $tRNA$ -Moleküls statt, der Spaltungen mit Nucleasen nur schwer zugänglich ist, und stellt damit eine gute Ergänzung der enzymatischen Methoden dar.

Auf einem anderen Weg gelang die Spaltung der $tRNA^{Phe}$ an einer dritten Stelle. Die bekannte, durch zweiwertige Metallionen katalysierte Hydrolyse von RNA (61,69) ließ sich unter bestimmten Bedingungen mit Mg^{++} -Ionen spezifisch durchführen. Die

Mg⁺⁺-katalysierte Spaltung lieferte durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung zwischen den beiden Dihydrouridin-Nucleosiden der hU-Schleife die Fragmente Phe 1-16 und Phe 17-76 in hohen Ausbeuten (Abb. 16). Die Spezifität der Spaltung hing von der Konformation der tRNA ab. Der Befund, daß die Anticodon-Schleife, die sonst chemisch und enzymatisch leicht angegriffen wird, nicht gespalten wurde, ist ein Hinweis auf eine starre, durch Basenstapelung stabilisierte Struktur dieser Schleife.

An der durch Abspaltung der Base Y⁺ aus tRNA^{Phe} erhaltenen Aldehydgruppe konnten auch Synthesen durchgeführt werden. Durch Kondensation mit den primären Aminogruppen der fluoreszierenden Farbstoffe Proflavin (PF) und Ethidiumbromid (EB) wurden in fast quantitativer Reaktion Fluoreszenzmarkierungen in tRNA^{Phe} eingeführt (Abb. 22). Aus dem Vergleich der Absorptions- und Emissionsspektren der kovalent gebundenen Farbstoffe mit denen assoziativ gebundener wird auf eine starke Wechselwirkung der Farbstoffe in tRNA^{Phe} mit den benachbarten Basen der Anticodon-Schleife geschlossen.

In Zusammenarbeit mit der Gruppe von G. Maass wurden die bei der thermischen Denaturierung auftretenden Helix-Knäuel-Übergänge untersucht an tRNA^{Phe} aus Hefe und Weizen, ihren Halbmolekülen und deren homologen und heterologen Kombinationen. Die Ergebnisse der Schmelzkurven (Abb. 26, 31 und 32) und die mit Hilfe der Temperatursprung-Relaxationsmessung erhaltenen kinetischen Daten zeigten, daß in den intakten tRNAs, den tRNA-Fragmenten und ihren Kombinationen kooperative Übergänge stattfanden (Abb. 30 und 33). Die Reaktionsenthalpien dieser Prozesse stimmten mit den für die Doppelstrangbereiche des

Kleeblattmodells abgeschätzten überein. Die Struktur der tRNA^{Phe} , der Halbmoleküle und ihrer Kombinationen wird demnach in Mg^{++} -freier Lösung im wesentlichen durch die Basenpaare des Kleeblattmodells stabilisiert. Aus diesem Befund wird abgeleitet, daß die im Kleeblattmodell vorliegende Anordnung das Grundelement der dreidimensionalen Struktur der tRNA^{Phe} darstellt.

Die PF-markierte tRNA^{Phe} verhielt sich in verschiedenen biochemischen Testsystemen ähnlich wie die unmodifizierte tRNA^{Phe} . tRNA^{Phe} -PF war mit Phe-tRNA-Synthetase aus Hefe weitgehend, mit der Synthetase aus E. coli teilweise aminoacylierbar und zeigte eine beträchtliche Aktivität im Poly U-abhängigen Ribosomenbindungstest (Tabelle 8). Der bei der Abspaltung von Y^+ beobachtete Verlust der beiden letztgenannten Aktivitäten der tRNA^{Phe} ist auf eine, durch physikalische Messungen nachgewiesene, Konformationsänderung der tRNA zurückgeführt worden (27,102). Diese Deutung wird gestützt durch den Befund, daß beide Aktivitäten durch den Einbau des PF teilweise wiederhergestellt wurden. Diese Funktionen, wie auch die Aminoacylierung im homologen System, sind demnach nicht von Y^+ selbst abhängig. Offenbar ist aber die Anwesenheit einer Base neben dem Anticodon notwendig zur Aufrechterhaltung einer bestimmten Konformation der Anticodon-Schleife. Mit diesen Ergebnissen sind die Voraussetzungen erfüllt, die eine Verwendung des kovalent an tRNA^{Phe} gebundenen PF als Indikator für die Untersuchung der Struktur der tRNA^{Phe} und ihrer Wechselwirkungen mit anderen Makromolekülen erlauben.

Die Untersuchung der verschiedenen Kombinationen der tRNA^{Phe} -Fragmente im Aminoacylierungstest zeigte (Abb. 34), daß Ketten-

brüche in der hU- oder Anticodon-Schleife oder der S-Region der tRNA^{Phe} nicht zum Verlust der Akzeptoraktivität führten. Eine Kombination, der die Nucleotide 37-46 fehlten, war noch aminoacylierbar, während Kombinationen, bei denen der hU- oder TYC-Stamm nicht intakt waren, keine Aktivität besaßen. Aus den Ergebnissen geht hervor, daß diese beiden Doppelstrangbereiche eine wichtige Funktion bei der Aminoacylierung oder der Aufrechterhaltung der aktiven Konformation der tRNA haben, während der 3'-Strang des Anticodon-Stamms und ein Teil der S-Region dabei keine wesentliche Rolle spielen. Die Synthetaseerkennungsregion der tRNA^{Phe} kann demnach nicht in diesem Bereich des tRNA-Moleküls lokalisiert sein.

8. Literaturverzeichnis.

1. F. Lipmann, Science 164 (1969) 1024
2. The Mechanism of Protein Synthesis, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34 (1969)
3. H.G. Zachau, Angew. Chem. 81 (1969) 645
4. R.W. Chambers, Progr. Nucleic Acid Res. and Molecular Biology 11 (1971) 489
5. T. Lindahl, A. Adams u. J.R. Fresco, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 55 (1966) 941
6. W.J. Gartland u. N. Sueoka, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 55 (1966) 948
7. S. Arnott, Progr. in Biophysics and Molecular Biology 22 (1971) 181
8. G. Felsenfeld u. H.T. Miles, Annu. Rev. Biochem. 36 (1967) 407
9. J.J. Englander, N.R. Kallenbach u. S.W. Englander, J. Mol. Biol. 63 (1972) 153
10. U.L. RajBhandary, S.H. Chang, A. Stuart, R.D. Faulkner, R.M. Hoskinson u. H.G. Khorana, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57 (1967) 751
11. K. Nakanishi, N. Furutachi, M. Funamizu, D. Grunberger u. I.B. Weinstein, J. Am. Chem. Soc. 92 (1970) 7617
12. R. Thiebe, H.G. Zachau, L. Baczynskyj, K. Biemann u. J. Sonnenbichler, Biochim. Biophys. Acta 240 (1971) 163
13. F. Cramer, Progr. Nucleic Acid Res. and Molecular Biology 11 (1971) 391
14. J.R. Penswick, Thesis, Ithaka N.Y., 1966
15. A.A. Bayev, I. Fodor, A.D. Mirzabekov, V.D. Axelrod u. L. Ya. Kazarinova, Molekularnaya Biologiya 1 (1967) 859
16. A.D. Mirzabekov, D. Lastity, E.S. Levina u. A.A. Bayev, FEBS Letters 7 (1970) 95

17. T. Seno, M. Kobayashi u.S. Nishimura, Biochim. Biophys. Acta 190 (1969) 285
18. K. Harbers, R. Thiebe u. H.G. Zachau, Europ. J. Biochem. im Druck
19. P. Philippsen u. H.G. Zachau, FEBS Letters 15 (1971) 69
20. G.W. Rushizky u. H.A. Sober, Progr. Nucleic Acid Res. and Molecular Biology 8 (1968) 171
21. N.K. Kochetkov u. E.I. Budowsky, Progr. Nucleic Acid Res. and Molecular Biology 9 (1969) 403
22. H. Witzel, Ann. Chem. 620 (1959) 126
23. D.W. Verwoerd, W. Zillig u.H. Kohlhage, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 332 (1963) 184
24. N.K. Kochetkov, E.I. Budowsky, V.P. Demushkin, M.F. Turchinsky, N.A. Simukova u. E.D. Sverdlov, Biochim. Biophys. Acta 142 (1967) 35
25. N.K. Kochetkov, E.I. Budowsky, M.F. Turchinsky u. N.A. Simukova, Biochem. Biophys. Res. Commun. 19 (1965) 49
26. W. Seifert u. W. Zillig, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348 (1967) 1017
27. R. Thiebe u. H.G. Zachau, Europ. J. Biochem. 5 (1968) 546
28. L. Stryer, Science 162 (1968) 526
29. C. Sadron, Proc. First Europ. Biophysics Congress, Vol.VI, Baden 1971, S. 397
30. L.M. Fink, S. Nishimura u. I.B. Weinstein, Biochemistry 9 (1970) 496
31. D. Schneider, Dissertation, Braunschweig 1971
32. J.E. Churchich, Biochim. Biophys. Acta 75 (1963) 274
33. K. Beardsley u. C.R. Cantor, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 65 (1970) 39
34. D.C. Ward, E. Reich u. L. Stryer, J. Biol. Chem. 244 (1969) 1228
35. R. Bittmann, J. Mol. Biol. 46 (1969) 251

36. T. Tao, J.H. Nelson u. C.R. Cantor, *Biochemistry* 9 (1970) 3514
37. H. Grosjean, J. Wérenne u. H. Chantrenne, *Biochim. Biophys. Acta* 166 (1968) 616
38. A. Surovaya, O. Borisova, T. Jilyaeva, V. Scheinker u. L. Kisselev, *FEBS Letters* 8 (1970) 201
39. R. Rigler, E. Cronvall, M. Ehrenberg, U. Pachmann, R. Hirsch u. H.G. Zachau, *FEBS Letters* 18 (1971) 193
40. B. Beltchev u. M. Grunberg-Manago, *FEBS Letters* 12 (1970) 24
41. H. Fraenkel-Conrat u. A. Steinschneider, in: *Methods in Enzymology* 12 B (Hrsg. L. Grossman u. K. Moldave), Academic Press, New York 1968, S. 243
42. H.C. Neu u. L.A. Heppel, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 2927
43. C.-T. Yu u. P.C. Zamecnik, *Biochim. Biophys. Acta* 45 (1960) 148
44. P.R. Whitfield u. R. Markham, *Nature* 171 (1953) 1151
45. R. Thiebe u. H.G. Zachau, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36 (1969) 1024
46. R. Thiebe u. H.G. Zachau, in: *Methods in Enzymology* 20 (Hrsg. L. Grossman u. K. Moldave), Academic Press, New York 1971, S. 179
47. T. Igo-Kemenes, *Dissertation, München* 1970
48. T. Igo-Kemenes u. H.G. Zachau, *Europ. J. Biochem.* 10 (1969) 549
49. A.S. Jones, A.M. Mian u. R.T. Walker, *J. Chem. Soc. (C)* 1968, 2042
50. M.F. Turchinsky, L.I. Guskova, I. Hazai, E.I. Budowsky u. N.K. Kochetkov, *Biochim. Biophys. Acta* 254 (1971) 366
51. D. Brown, F. Hayes u. A. Todd, *Chem. Ber.* 90 (1957) 936
52. E.M. Fry, E.J. Wilson u. C.S. Hudson, *J. Am. Chem. Soc.* 64 (1942) 872
53. O. Meyerhof u. K. Lohmann, *Biochem Z.* 271 (1934) 89

54. M.F. Turchinsky, L.I. Guskova, I. Hazai, E.I. Budowsky
u. N.K. Kochetkov, Molekularnaya Biologiya 3 (1970) 428
55. L.I. Smith u. R.H. Anderson, J. Org. Chem. 16 (1951) 963
56. A. Steinschneider, Biochemistry 10 (1971) 173
57. P.D. Lawley u. P. Brookes, Biochem J. 89 (1963) 127
58. T. Igo-Kemenes u. H.G. Zachau, Europ. J. Biochem.
18 (1971) 292
59. P. Cerutti, J.W. Holt u. N. Miller, J. Mol Biol.
34 (1968) 505
60. U.L. RajBhandary, A. Stuart u. S.H. Chang, J. Biol. Chem.
243 (1968) 584
61. K. Dimroth, L. Jaenicke u. D. Heinzl, Ann. Chem.
566 (1950) 206
62. E. Bamann, H. Trapmann u. F. Fischler, Biochem Z.
326 (1954) 89
63. K. Dimroth, H. Witzel, W. Hülsen u. H. Mirbach, Ann. Chem.
620 (1959) 94
64. J.J. Butzow u. G.L. Eichhorn, Biopolymers 3 (1965) 95
65. J.W. Huff, K.S. Sastry, M.P. Gordon u. W.E.C. Wacker,
Biochemistry 3 (1964) 501
66. T. Lindahl, J. Biol. Chem. 242 (1967) 1970
67. D.M. Brown, D.I. Magrath, A.H. Neilson u. A.R. Todd,
Nature 177 (1956) 1124
68. H. Witzel, Progr. Nucleic Acid Res. 2 (1963) 221
69. J.J. Butzow u. G.L. Eichhorn, Biochemistry 10 (1971) 2019
70. H. Witzel, Ann. Chem. 635 (1960) 182
71. B. Singer u. H. Fraenkel-Conrat, Biochim. Biophys. Acta
76 (1963) 143
72. G.L. Eichhorn, E. Tarien u. J.J. Butzow, Biochemistry
10 (1971) 2014
73. B. Krebs, C. Wernert u. G. Dirheimer, Compt. Rend. Acad.
Sci., im Druck

74. J.T. Penniston u. P. Doty, Biopolymers 1 (1963) 145
75. R.H. Reeves, C.R. Cantor u. R.W. Chambers, Biochemistry 9 (1970) 3993
76. D. Riesner, Dissertation, Braunschweig 1970
77. R. Barber, Biochim. Biophys. Acta 238 (1971) 60
78. M. Molinaro, L.B. Sheiner, F.A. Neelon u. G.L. Cantoni, J. Biol. Chem. 243 (1968) 1277
79. M. Litt, Biochemistry 8 (1969) 3249
80. M. Yoshida, Y. Kaziro u. T. Ukita, Biochim. Biophys. Acta 166 (1968) 646
81. A.V. Rake u. G.M. Tener, Biochemistry 5 (1966) 3992
82. J. Eisinger, B. Feuer u. T. Yamane, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 65 (1970) 638
83. O.C. Uhlenbeck, J. Baller u. P. Doty, Nature 225 (1970) 508
84. J. Eisinger, Biochem. Biophys. Res. Commun. 43 (1971) 854
85. W. Fuller u. A. Hodgson, Nature 215 (1967) 817
86. R.-E. Streeck, Dissertation, München 1971
87. W. Wintermeyer u. H.G. Zachau, FEBS Letters 18 (1971) 214
88. R. Criegee, Z. Angew. Chem. 53 (1940) 321
89. G.P. Ellis u. J. Honeyman, Adv. Carbohydrate Chemistry 10 (1955) 95
90. A. Blake u. A.R. Peacocke, Biopolymers 6 (1968) 1225
91. N.J. Pritchard, A. Blake u. A.R. Peacocke, Nature 212 (1966) 1360
92. L.S. Lerman, J. Mol. Biol. 3 (1961) 18
93. R. Römer, Dissertation, Braunschweig 1970
94. R. Römer, D. Riesner, S.M. Coutts u. G. Maass, Europ. J. Biochem. 15 (1970) 77; D. Riesner, R. Römer u. G. Maass, ib. S. 35
95. D. Riesner, R. Römer u. G. Maass, Biochem. Biophys. Res. Commun. 35 (1969) 369

96. R. Römer, D. Riesner, G. Maass, W. Wintermeyer, R. Thiebe
u. H.G. Zachau, FEBS Letters 5 (1969) 15
97. G. Maass, unveröffentlichte Messungen
98. D. Pörschke, Dissertation, Braunschweig 1968; M. Eigen,
in: Nobel-Symposium 5 (Hrsg. S. Claeson), Almquist u.
Wiksel, Stockholm 1967, S. 345
99. J. Brahms, J.C. Maurizot u. A.M. Michelson, J. Mol. Biol.
25 (1967) 481
100. E. Neumann u. Th. Ackermann, J. Phys. Chem. 73 (1969) 2170
101. W. Wintermeyer, R. Thiebe, H.G. Zachau, D. Riesner,
R. Römer, u. G. Maass, FEBS Letters 5 (1969) 23
102. R. Thiebe u. H.G. Zachau, Biochim. Biophys. Acta
217 (1970) 294
103. R. Thiebe, K. Harbers u. H.G. Zachau, Europ. J. Biochem.
im Druck
104. M.V. Nirenberg u. P. Leder, Science 145 (1964) 1399
105. P. Philippsen, Dissertation, München 1971
106. K. Harbers, Dissertation, München 1971
107. N. Imura, G.B. Weiss u. R.W. Chambers, Nature 222 (1969)
1146
108. A.D. Mirzabekov, D. Lastity, E.S. Levina u. A.A. Bayev,
Nature New Biology 229 (1971) 21
109. L.H. Shulman u. R.W. Chambers, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.
61 (1968) 308
110. P. Philipps, Nature 223 (1969) 374
111. B. Dudock, C. DiPeri, K. Scilleppi u. B. Reszelbach,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68 (1971) 681
112. D.R. Harkness u. R.J. Hilmo, Biochem. Biophys. Res.
Commun. 9 (1962) 393
113. P.S. Chen jr., T.Y. Toribara u. H. Warner, Anal. Chem.
28 (1956) 1756
114. B.N. Ames u. D.T. Dubin, J. Biol. Chem. 235 (1960) 769

115. H.G. Zachau, D. Dütting u. H. Feldmann, Hoppe-Seylers
Z. physiol. Chem. 347 (1966) 212
116. K. Daneck, G. Weimann u. F. Cramer, Experientia 21 (1965)
417
117. H.G. Zachau, in: Methoden der enzymatischen Analyse
(Hrsg. H.U. Bergmeyer), Bd. II, Verlag Chemie, Weinheim
1970, S. 1828
118. E.G. Richards, J.A. Coll u. W.B. Gratzer, Anal. Biochem.
12 (1965) 452
119. R.H. Hall, Biochem. Biophys. Res. Commun. 12 (1963) 361
120. J.W. Jones u. R.K. Robins, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963)
193
121. J.B. Pridham, Anal. Chem. 28 (1956) 1967
122. H.T. Gordon, W. Thornburg u. L.N. Werum, Anal. Chem.
28 (1956) 849
123. F. Melchers u. H.G. Zachau, Biochim. Biophys. Acta
91 (1964) 559
124. G.A. Bray, Anal. Biochem. 1 (1960) 279
125. P. Philippsen, R. Thiebe, W. Wintermeyer u. H.G. Zachau,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 33 (1968) 922
126. R. Rigler, E. Cronvall, R. Hirsch, U. Pachmann u.
H.G. Zachau, FEBS Letters 11 (1970) 320
127. R.J. Hilmo, persönliche Mitteilung an H.G. Zachau
128. A. Garen u. C. Levinthal, Biochim. Biophys. Acta
38 (1960) 470
129. W.E. Razzel, in: Methods in Enzymology 6 (Hrsg. S.P.
Colowick u. N.O. Kaplan), Academic Press, New York 1963,
S. 236
130. A. Bernardi u. G. Bernardi, Biochim. Biophys. Acta
155 (1968) 360
131. K. Takahashi, J. Biochem. (Tokio) 49 (1961) 1
132. M. Kunitz, J. Gen. Physiol. 24 (1940) 15

133. M.V. Nirenberg, in: Methods in Enzymology 6 (Hrsg. S.P. Colowick u. N.O. Kaplan), Academic Press, New York 1963, S. 17
134. Laboratory Manual WHL 70 der Fa. W. u. R. Balston Ltd., Maidstone, England
135. J. Gillam, S. Millward, D. Blew, M.v. Tigerstrom, E. Wimmer u. G.M. Tener, Biochemistry 6 (1967) 3043
136. Europ. J. Biochem. 15 (1970) 203; 18 (1971) 588

9. Verzeichnis der Abkürzungen.

A_{260}	Extinktion bei 260 nm und 1 cm Lichtweg
BB	Bromphenolblau
BD-Cellulose	benzoylierte DEAE-Cellulose
DEAE	Diäthylaminoäthyl
EB	Ethidiumbromid
$m^7G(\text{Alkali})$	Produkt der Alkalibehandlung des m^7G
P	Phosphorsäureestergruppe in RNA
PDE	Phosphodiesterase
PF	Proflavin
PME	alkalische Phosphatase aus <i>E. coli</i>
R_A, R_B, R_F, R_{Up}	Wanderungsstrecke einer Substanz relativ zur Wanderungsstrecke von Adenosin, Bromphenolblau, der Lösungsmittelfront oder UMP
(rib)	Produkt, das bei der Kettenspaltung mit Anilin aus der freien Ribose entsteht; der unveränderte Zucker wird mit - Ribose - bezeichnet
(rib ⁺)	Reduktionsprodukt(e) von (rib)
(rib ⁺⁺)	Produkt der Alkalibehandlung von (rib)
RNase	Ribonuclease
tRNA ^{Phe}	Phenylalanin-spezifische Transfer-Ribonucleinsäure aus Hefe
tRNA ^{Phe} (HCl)	tRNA ^{Phe} nach Abspaltung der Base Y ⁺
tRNA ^{Phe} -PF	tRNA ^{Phe} , die PF anstelle von Y ⁺ trägt
tRNA ^{Phe} -PF-red	reduzierte tRNA ^{Phe} -PF
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Y	seltenes Nucleosid in der Position 37 der tRNA ^{Phe}
Y ⁺	Base des Nucleosids Y

Die Abkürzungen für die anderen Nucleoside folgen den Regeln der IUPAC-IUB (136).

Lebenslauf

Am 22. Dezember 1942 wurde ich als zweites Kind des Kaufmanns Otto Wintermeyer und der Sängerin Carmen Wintermeyer in Mannheim geboren. Dort besuchte ich die Volksschule und von 1953 - 1962 das humanistische Karl-Friedrich-Gymnasium. Im Sommer-Semester 1962 begann ich das Chemiestudium an der Universität München. 1968 legte ich das Hauptdiplom-Examen ab. Nach Beendigung der Diplomarbeit, die ich am Institut für Physiologische Chemie der Universität München anfertigte, erhielt ich am 1. September 1969 das Diplom. Seither arbeitete ich am selben Institut an der vorliegenden Dissertation.

